



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION		WO 96/12809	
(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/49, C07K 14/16, 16/10, A61K 39/21		A2	(11) Numéro de publication internationale: (43) Date de publication internationale: 2 mai 1996 (02.05.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01391 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1995 (20.10.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/12554 20 octobre 1994 (20.10.94) FR 95/02526 3 mars 1995 (03.03.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHARNEAU, Pierre [FR/FR]; 6 bis, rue des Ecoles, F-75005 Paris (FR). CLAVEL, François [FR/FR]; 94, rue de l'Assomption, F-75016 Paris (FR). BORMAN, Andrew [FR/FR]; 14, rue des Moulins, F-28210 Nongent-le-Roi (FR). QUILLET, Caroline [FR/FR]; 110, rue de Bagneux, F-92120 Montrouge (FR). GUETARD, Denise [FR/FR]; 4 bis, rue Anselme-Payen, F-75015 Paris (FR). MONTAGNIER, Luc [FR/FR]; 21, rue de Malabry, F-92000 Le Plessis-Robinson (FR). DONJON DE SAINT-MARTIN, Jacqueline [FR/FR]; 65, avenue Victor-Hugo, F-92140 Clamart (FR). COHEN, Jacques, H., M. [FR/FR]; 17, rue de Sully, F-51100 Reims (FR).		(74) Mandataires: ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD S.A. etc.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: AU, CA, CN, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>	

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES OF HIV-1 TYPE (OR SUBTYPE) O RETROVIRUS ANTIGENS

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES D'ANTIGENES RETROVIRAUX VIH-1 GROUPE (OU SOUS-GROUPE) O

(57) Abstract

An HIV-1 type (or subtype) O retrovirus protein, or a natural or synthetic polypeptide or peptide including at least a part of said protein, which is capable of being recognised by antibodies isolated from a serum resulting from infection by an HIV-1 type O VAU strain or an HIV-1 type (or subtype) O DUR strain.

(57) Abrégé

L'invention concerne une protéine de rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ou polypeptide ou peptide naturel ou synthétique comprenant au moins une partie de ladite protéine, susceptible d'être reconnue par des anticorps isolables à partir de sérum obtenu suite à une infection par une souche VIH-1 groupe O VAU, ou une souche VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR.

OPEN LOOP VS REGION

---TC---OATP---	---O-OT-THR-I-OT---	WAD
CPAPMHTKSTIRGROPSAFVY	YOX IOMH RQAKG	LAT
---E-S---	---TWO-I-OI---	OTY
---A-YO---OATP---	---L-OLY-TR-SUBST---	EMJ
---O---RINY---	---OLY-T-V-OI---	NAL
---O-Y-TAKNIGISI---	---OATP-T---I-OI---	458
---O-O---ON VOI	---KITH-SWY-OI---	CPS

[illegible]

DOMINANT REGION OF GP1

[illegible]

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LJ	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES D'ANTIGENES RETROVIRAUX
VIH-I GROUPE (OU SOUS-GROUPE) O

5

L'invention concerne les antigènes obtenus par expression de
séquences nucléotidiques ou par synthèse chimique par exemple en
utilisant des synthétiseurs de marque Applied Biosystems, présents dans
les variants d'VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et particulièrement les
antigènes correspondant à ceux isolables des particules virales. A titre
d'exemple de virus VIH-1 du sous-groupe O, on se réfère à l'isolat VIH-
1_(VAU) ainsi qu'à l'isolat VIH-1_(DUR).

15

Rappelons que la désignation HIV utilisée dans ce texte
correspondant à la désignation VIH également utilisée.

L'invention concerne également les anticorps, polyclonaux ou
monoclonaux, induits par ces antigènes.

20

L'invention est également relative à des séquences d'ADN
clonées soit présentant une analogie de séquence, soit une
complémentarité avec l'ARN génomique du virus précité. Elle concerne
aussi des procédés de préparation de ces séquences d'ADN clonées.
L'invention concerne également les polypeptides contenant des séquences
d'acides aminés codés par les séquences d'ADN clonées.

25

30

De plus, l'invention concerne des applications des antigènes
mentionnés précédemment à la détection in vitro chez l'homme de
potentialité de certaines formes du SIDA et, en ce qui concerne certains
d'entre eux, à la production de compositions immunogènes et de
compositions vaccinales contre ce rétrovirus. De même, l'invention
concerne les applications aux mêmes fins des susdits anticorps et, pour

certaines d'entre eux, leur application à la production de principes actifs de médicaments contre le sida humain.

L'invention concerne également l'application des séquences d'ADN clonées et de polypeptides obtenus à partir de ces séquences
5 comme sondes ou amorces pour l'amplification génique, dans des trousse de diagnostics.

L'invention est également relative à des compositions d'antigènes, qui peuvent être obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un hôte cellulaire recombinant et permettant le diagnostic
10 d'une infection due à un rétrovirus humain de type HIV indépendamment du sous-type VIH-1 ou VIH-2. De telles compositions comprennent au moins un peptide choisi parmi les peptides antigéniques communs aux virus VIH-1, VIH-2, VIH-1_(DUR) et VIH-1_(NAU) ou des variants de ces peptides antigéniques possédant des caractéristiques immunogènes semblables.

L'invention vise également des compositions permettant le diagnostic spécifique d'une infection due à un rétrovirus humain de type VIH-1, plus particulièrement le VIH-1, groupe M, le VIH-2 ou le VIH-1
15 groupe (ou sous-groupe) O et comprenant au moins un peptide antigénique spécifique du virus VIH-1, un peptide antigénique spécifique du virus VIH-2 et un peptide antigénique spécifique du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O ou des variants de ces peptides antigéniques possédant des caractéristiques immunogènes semblables. Plus
20 particulièrement, les peptides antigéniques sont dérivés de la protéine d'enveloppe des virus VIH-1 groupe M, VIH-2 et VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O.

L'invention vise par ailleurs un peptide permettant une détection d'anticorps anti-HIV que les peptides de l'art antérieur ne permettaient pas toujours de détecter en se basant notamment sur la
25 découverte d'une nouvelle souche VIH-1: VIH-1 DUR. L'antisérum dirigé contre elle ne présente pas toujours de réactivité avec les peptides du consensus HIV tel qu'il est utilisé de nos jours. Le terme «consensus

30

HIV » se réfère aux régions conservées entre isolats et dont la mise en évidence est essentielle à la conception de vaccins ou de réactifs diagnostiques, et dont les mutations confèrent la résistance aux médicaments antiviraux. Le terme «peptide» utilisé dans le présent texte, définit aussi bien les oligopeptides que des polypeptides.

Etat de la technique

Deux types de virus de l'immunodéficience humaine (HIV) ayant une responsabilité dans le développement d'un SLA ou du SIDA ont été isolés et caractérisés. Un premier virus dénommé LAV-1 ou VIH-1 a été isolé et décrit dans la demande de brevet GB 8324.800 et la demande EP 84401.834 du 14/09/1984. Ce virus a également été décrit par F. Barré-Sinoussi et al dans Science (1983), 220, 868-871.

Le rétrovirus HIV de type 2 appartient à une classe distincte et n'a qu'une parenté immunologique réduite avec des rétrovirus HIV de type 1. Les rétrovirus VIH-2 ont été décrits dans la demande de brevet européen n° 87.400.151.4 publiée sous le numéro 239.425.

Le rétrovirus VIH-1 est le plus courant et sa présence est prédominante dans plusieurs régions du monde. Quant au rétrovirus VIH-2, il est le plus souvent retrouvé en Afrique de l'Ouest, bien que sa propagation à l'extérieur de cette région ait été récemment documentée par Grez et al, (1994) J. Virol. 68, 2161-2168.

L'ensemble des lentivirus de l'immunodéficience des primates, comprenant les virus du type 1 et du type 2 de l'immunodéficience humaine ainsi que plusieurs types de virus de primates non humains, augmente en taille et en complexité. Le plus courant de ces virus, le VIH-1, se répand actuellement sous forme d'épidémie mondiale et il est responsable d'un problème de santé public majeur. Peu après l'identification et la caractérisation moléculaire de ce virus, il a été reconnu comme étant très variable, et comprend actuellement plusieurs sous-types

(1994) VIH-1 subtypes and phylogenetic trees. In: Human Retrovirus and AIDS 1994; Myers, G., Korber, B., Wain-Hobson, S., Smith, R.F. and Pavlakis, G.N., eds. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. III-2 - III-9.). Cette distinction de sous-types est surtout basée sur la divergence des gènes *gag* et *env*. Au moins 6 sous-types ont été identifiés, désignés A à F, mais plusieurs sont encore susceptibles d'émerger de l'enquête mondiale poussée en cours sur les isolats du VIH-1. Il a été trouvé que ces différents sous-types sont équidistants les uns des autres, dans un profil phylogénétique dit phylogénie en étoile, ce qui suggère que les différents sous-types du VIH-1 auraient évolué et divergé de façon synchrone à partir d'un ancêtre commun.

Récemment, deux virus distincts de ce groupe de virus VIH-1 ont été isolés et caractérisés. Ces deux virus ont été obtenus de patients vivant au Cameroun, en Afrique de l'Ouest Centrale (Gürtler, et al. 1994, Vanden Heasevelde, et al. 1994). Leur séquence, plus particulièrement la séquence de leur gène *env* (enveloppe), montre clairement que ces virus appartenaient à une catégorie distincte de virus apparentés au VIH-1, désignée VIH-1 groupe O (NKENGASONG et al., 1993).

Toutefois, la diversité des isolats à l'intérieur de ce groupe de virus apparentés au VIH-1 n'est pas connue, et sa propagation en dehors de l'Afrique n'a pas été documentée.

Une contrainte générale, dans la mise au point de tests sérologiques HIV, est d'éviter aussi bien les réactions faussement positives - ou faussement négatives - tout en conservant ou améliorant la sensibilité que permettent les tests antérieurs en détection de séropositivité.

Les tests basés sur l'emploi de peptide(s) consensus, essentiellement dérivés du gène « *env* », ont été considérés comme une solution presque idéale jusqu'à ce que la découverte du variant VIH-1-O fasse entrevoir la possibilité de résultats faussement négatifs (Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African

human immuno-deficiency virus isolate. J. Virol. 1994; 68: 1586-96 ; a new subtype of human immuno-deficiency virus type 1 (MPV-5180) from Cameroon. J. Virol. 1994; 68:1581-85).

La non-réactivité de certains tests à antigène peptidique « *env* », chez des patients présentant quand même certains syndromes cliniques caractéristiques du SIDA ou des syndromes lymphadénopathiques qui parfois les précèdent, est, à ce jour, parfois imputée à une infection du groupe VIH-1-O (VIH-1/VIH-2 seronegativity in VIH-1 subtype O infected patients, Lancet 1994; 343:1393-94 ; New VIH-1 subtype in Switzerland. Lancet 1994; 344:270-71).

Description de l'invention

La présente invention a pour but de mettre à disposition des laboratoires de diagnostic des moyens, notamment des peptides spécifiques permettant une détection d'anticorps anti-HIV, qui étaient jusqu'à ce jour susceptibles d'être indétectables. Elle concerne également des mélanges de peptides issus de VIH-1 DUR et de peptides correspondants d'autres HIVs, de façon à éviter les résultats « faux négatifs » potentiels.

Elle concerne par ailleurs un procédé de détection et de discrimination dans un échantillon biologique entre des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus du type VIH-1-M et des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O.

L'invention découle des observations faites sur une femme séropositive, ayant séjourné au Cameroun et ayant révélé une réactivité sérologique atypique, au cours de plusieurs tests de dépistages de l'infection HIV, ces derniers ayant été confirmés par des techniques de « Western blot ».

Du fait de cette réactivité sérologique atypique, en particulier du manque de réactivité sur certains tests de troisième génération, même modifiés pour le type O, les inventeurs ont jugé intéressant d'entreprendre

un séquençage de certaines parties du génome de cette souche VIH-1 DUR, plus spécifiquement des gènes GAG et ENV.

5 Cependant, les amplifications géniques par PCR à l'aide d'amorces issues du groupe M et d'amorces connues du groupe O ont été sans résultat pour les parties codant la boucle V3 de gp120, et pour la région immunodominante de gp41. Seule la région GAG était amplifiable à l'aide d'amorces connues dans l'art antérieur (Loussert-Ajaka I, Lancet 1994 ; 343:1393). Un autre but de la présente invention est par conséquent la détermination d'amorces susceptibles de palier ce problème. Ces amorces pourront indifféremment être dénommées « primers » par la suite.

10 On a déterminé des séquences partielles des glycoprotéines gp41 et de gp120 ainsi que de protéines de capsid (gène GAG) à partir d'ADN lymphocytaire et de cultures virales, indiquant que cette souche VIH-1 DUR appartient d'une part au groupe VIH-1-O, et qu'elle diffère de façon importante du groupe M, plus particulièrement pour gp41 et gp120.

15 Ainsi, on a pu mettre en évidence, plus particulièrement à propos de la séquence GAG de VIH-1 (DUR), l'existence de séquences consensus dans le groupe O, sur plusieurs zones, distinctes de séquences consensus du groupe M sur les mêmes zones.

20 Le clonage des séquences codant les fragments de GAG, gp41 et gp120 de VIH-1 (DUR) a été effectué dans un plasmide Bluescript® contenant un site PST1. Les produits d'amplification ont été clonés soit selon les techniques classiques utilisant les amorces universelles T3 et T7, soit directement séquencés par l'utilisation des amorces de la précédente amplification. Les séquences ont ensuite été déterminées par le dispositif automatique de séquençage Applied Biosystems 373A (ESGS Montigny le Bretonneux, France).

25 Dans le contexte de la présente invention, les inventeurs ont isolé et séquencé le gène env d'un isolat du groupe O, I VIH-1 (VAU), obtenu d'une patiente française qui n'a jamais voyagé en dehors de

l'Europe et qui est mort du SIDA en 1992. Selon sa séquence d'enveloppe, le VIH-1_(VAU) est apparenté aux deux virus camerounais HIV_{ANT70} et HIV_{MVP5180} récemment caractérisés. L'analyse phylogénétique des séquences *env* révèle que les trois virus semblent constituer un groupe distinct, qui sera appelé ici VIH-1 groupe O. L'isolement du VIH-1_(VAU) de cette patiente indique également qu'une certaine propagation des VIH-1 du groupe O s'est déjà produite en dehors de l'Afrique.

Isolement du virus VIH-1_(VAU)

VIH-1_(VAU) a été isolé en 1992 d'une patiente française âgée de 41 ans atteinte du SIDA. Cette patiente présentait en 1986 une leucopénie sévère associée à un carcinome du col utérin. Néanmoins, elle a progressivement montré des signes d'infections opportunistes, avec une baisse du nombre de cellules T CD4⁺ circulantes et elle est morte du SIDA en 1992. Des anticorps anti-VIH-1 ont d'abord été détectés par ELISA (Elavia, SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, et Test ABBOTT) en 1990.

La patiente n'avait jamais voyagé en dehors de l'Europe, n'avait pas utilisé de médicaments par voie intraveineuse et n'avait subi aucune transfusion sanguine connue. Aucun partenaire sexuel originaire de l'Afrique n'a été identifié. Elle a donné naissance à un enfant en bonne santé en 1971, mais un fils, né en 1980, est mort à l'âge d'un an suite à un épisode clinique très suggestif de SIDA néo-natal. Son troisième enfant né en 1983 et son mari sont actuellement en bonne santé et non infectés.

L'isolement du virus a été réalisé de la manière suivante : les cellules CD8⁺ présentes dans les PBMC (lymphocytes sanguins périphériques) de la patiente ont été éliminées à l'aide de billes revêtues d'anticorps IOT8 (Immunotech). Ces PBMC restantes ont été stimulées à la PHA, puis cocultivées avec des PBMC épuisées en CD8 provenant d'un donneur sain et stimulées à la PHA. La croissance virale dans la coculture a été suivie par dosage de l'activité transcriptase inverse (RT) du

sumageant t par test ELISA d la p24 du VIH-1 (coffret de diagnostic commercialisé par DuPont de Nemours). Le virus obtenu de la coculture initiale a été soumis à plusieurs passages dans des cultures de PBMC épuisées en CD8 et stimulées à la PHA. Plusieurs tentatives ont été réalisées pour infecter par le VIH-1_(VAU) diverses lignées cellulaires transformées, dont des cellules MT4 (Harada, et al. 1985) et CEM (Rey, et al. 1989), ainsi que la lignée P4-2 de cellules HeLa-CD4-LTRLacZ (Clavel et Chameau 1994).

Caractérisation biologique du VIH-1_(VAU)

Deux semaines après la coculture des PBMC de la patiente épuisées en CD8, stimulées à la PHA, avec des cellules similaires d'un donneur sain, la production de virus a été détectée sous la forme d'un pic d'activité RT dans le sumageant de culture. Ce virus pouvait alors être soumis à des passages en série sur des PBMC normales, épuisées en CD8, stimulées à la PHA. Sur la figure 1, le panneau A représente la production du VIH-1_(VAU) dans des sumageants de cultures de PBMC infectées, contrôlées par dosage RT (cercles pleins) et ELISA de capture d'antigène p24 VIH-1 (cercles vides). La concentration de p24 VIH-1 est exprimée en ng/ml et l'activité RT en cpm/ μ l. Dans le panneau B, la même expérience a été effectuée avec un isolat primaire standard du VIH-1 d'un patient atteint du SIDA.

Bien que la croissance du VIH-1_(VAU) ait été facilement détectée à l'aide du dosage RT, la détection de virus dans les sumageants de culture à l'aide de l'ELISA p24 VIH-1 (DuPont) était nettement moins sensible. La figure 1 montre la comparaison entre les profils d'infection productive des PBMC avec soit le VIH-1_(VAU) soit un isolat primaire du VIH-1 d'un patient atteint du SIDA, dosés en RT ou p24. Pour des quantités équivalentes de particules, déterminées par dosage de l'activité RT dans les sumageants dosés, approximativement 25 fois moins de p24 a été détecté pour le VIH-1_(VAU) que pour l'autre isolat VIH-1. La différence peut

être consécutive au fait que l'anticorps monoclonal spécifique de la p24 du VIH-1, qui est utilisé pour revêtir les plaques ELISA, n'a qu'une faible affinité pour les produits gag du VIH-1_(VAU).

Plusieurs tentatives négatives ont été faites pour propager le
5 VIH-1_(VAU) sur des lignées de cellules T humaines transformées, sensibles au VIH-1. En particulier, des cocultures entre des PBMC infectées par le VIH-1(VAU) et soit des cellules MT4 soit des cellules CEM n'ont pas conduit à la propagation du virus. Il a également été trouvé que ce virus
10 n'était pas capable d'infecter des cellules HeLa CD4⁺ (P4-2) (Clavel et Charneau 1994) portant un gène lacZ inducible par le gène tat. De même, aucune réplication du VIH-1_(VAU) ne pouvait être détectée dans des lymphocytes sanguins périphériques activés de plusieurs chimpanzés.

L'analyse de la séquence d'enveloppe VIH-1_(VAU), qui sera
décrite en détail plus loin, et sa comparaison avec celle des deux isolats
15 camerounais récemment décrits indiquent que tous les trois virus appartiennent au même groupe de virus apparentés au VIH-1. De plus, cette comparaison indique que ces trois variantes du virus sont approximativement phylogénétiquement équidistantes les unes des autres. Par conséquent, chacune des trois variantes de virus constitue en soi un
20 sous-type, distinct, de leur groupe, qui est maintenant appelé VIH-1 groupe O. Ce groupe est distinct du groupe des autres isolats VIH-1, identifiés jusqu'ici, que les inventeurs appellent ici VIH-1, groupe M.

L'apparition de ce nouveau groupe pose la question de son
origine : est-ce que le groupe O a évolué à partir des virus du groupe M
25 (ou inversement) ou est-ce que chaque groupe a un passé distinct ? Les inventeurs pensent que dans la mesure où à la fois le groupe M et le groupe O présentent un profil de divergence interne similaire, il est vraisemblable qu'ils correspondent chacun à la diversification d'ancêtres distincts de virus dans des populations humaines distinctes. On ne peut
30 pas apprécier à partir des données phylogénétiques et virologiques actuellement disponibles si l'ancêtre de l'un ou l'autre des deux groupes

affaillait les humains de manière naturelle ou a été introduit chez les humains à partir d'autres espèces. Le seul virus proche du VIH-1 présent chez un primate non humain est l'isolat SIVCPZGAB (Huet, et al. 1990), isolé à partir d'un chimpanzé apparemment infecté de façon naturelle, qui est clairement distinct à la fois du groupe M et du groupe O, et pour lequel aucun équivalent humain n'a été trouvé. Il est peu probable que les virus du groupe O aient récemment évolué à partir d'un virus de chimpanzé dans la mesure où le VIH-1_(*NAU*) n'a pas réussi à se répliquer dans des lymphocytes de chimpanzés.

Pourquoi l'épidémie du groupe O n'apparaît-elle que maintenant, quelques 15 à 20 ans plus tard que le groupe M ? Il y a trois explications possibles : premièrement, l'introduction de l'ancêtre des virus du groupe O chez les humains se serait produite plus récemment que celle du groupe M; deuxièmement, il se pourrait qu'on ait permis au groupe M de se propager plus tôt que le groupe O en raison de différentes conditions sociales dans leur région d'origine; et troisièmement, les virus du groupe O auraient une capacité de transmission plus réduite, comparée à celle des virus du groupe M. Il a été proposé qu'une telle propriété explique l'absence de propagation mondiale significative du VIH-2, pour lequel une charge virale plus faible chez les sujets infectés est liée à une transmissibilité réduite (De Cock, et al. 1993). A cet égard, bien que nous n'ayons aucune donnée sur la charge virale chez les patients infectés par un VIH-1 du groupe O, le pouvoir pathogène de ces virus ne semble pas être différent de celui du VIH-1. La patiente chez qui le VIH-1_(*NAU*) a été isolé est morte du SIDA, comme le patient chez qui l'isolat HIV_{MVP5180} du groupe O a été obtenu.

Toutefois, l'histoire naturelle de l'infection de la patiente VIH-1_(*NAU*) n'est toujours pas claire, mais il existe plusieurs indications que cette patiente a été infectée avant 1980, comme le suggère la mort à cette date de son deuxième enfant atteint d'un syndrome ressemblant au SIDA.

L'invention concerne tout variant des séquences d'acide nucléique du virus VIH-1_(VAU) ou de tout virus équivalent du groupe O, contenant des protéines de structure qui présentent les mêmes propriétés immunologiques que les protéines de structure codées par le gène *env* comprenant la séquence décrite à la figure 6 et dénommée « vau », désignée encore par la SEQ ID N° 5.

La présente invention est également relative à des compositions contenant soit des antigènes selon l'invention, soit un mélange d'antigènes selon l'invention associés à des extraits originaux d'un ou plusieurs VIH-1 groupe O ou d'autres virus variants, d'une part, et d'un ou plusieurs VIH-2 et/ou VIH-1, d'autre part, ces compositions étant éventuellement marquées. On peut utiliser tous types de marqueur approprié : enzymatiques, fluorescents, radioactifs, etc.

Acides nucléiques

L'invention concerne les ADN ou fragments d'ADN, plus particulièrement ADN et fragments d'ADN clonés obtenus à partir de l'ARN, d'ADN_c ou d'amorces utilisables en PCR, ou autres méthodes d'amplification génique dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus VIH-1_(VAU). L'invention concerne encore particulièrement tous les ADN équivalents, notamment tout ADN présentant des homologies de séquence avec l'ADN du VIH-1_(VAU), en particulier avec la séquence codant la région *env* de la souche VIH-1_(VAU) comprenant la séquence correspondant à la SEQ ID N° 5 représentée à la figure 6 et appelée « vau ». L'homologie avec le VIH-1 groupe M est au moins égale à 50%, de préférence à 70% et plus avantageusement encore à environ 90%. D'une façon générale, l'invention concerne tout ADN (ou ARN) équivalent capable de s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN d'un rétrovirus VIH-1 du groupe O.

L'invention concerne aussi les séquences d'ARN correspondant aux séquences d'ADN définies ci-dessus.

L'invention concerne également le gène de l'intégrase du virus VIH-1_(VAU), comprenant la séquence identifiée par la désignation SEQ ID N° 7 ou s'hybridant avec la SEQ ID N° 7. L'invention vise aussi les ARN correspondant à l'ADN ci-dessus décrit.

5 L'invention a aussi pour objet des compositions contenant les peptides ou polypeptides codés par l'ADN susdite ou des fragments d'ADN.

Des oligonucléotides dérivés de la séquence VAU ou encore du gène de l'intégrase du virus VIH-1_(VAU), particulièrement des
10 oligonucléotides comprenant au moins 9 nucléotides, peuvent être utilisés pour la détection de séquences ADN ou ARN de virus VIH-1 du groupe O dans des prélèvements biologiques, des cultures cellulaires, ou des extraits de cellules, par la technique de la PCR ou toute autre technique d'amplification génique. Ces séquences pourraient être utilisées soit
15 comme amorces d'amplification génique soit comme sondes en vue de la détection spécifique des produits d'amplification génique. Sont utilisables également comme sonde d'hybridation, les produits d'amplification, ou leur séquence correspondante synthétique, obtenus par synthèse chimique (Applied Biosystems).

20 L'invention couvre également tout fragment d'au moins 100 nucléotides utilisable comme sonde dans des réactions d'hybridation et capable de permettre une réaction avec une partie du génome d'un variant VIH-1_(VAU) dans des conditions d'hybridation de forte stringence.

25 Clonage et séquençage du gène *env* VIH-1_(VAU)

Pour l'amplification initiale par PCR de l'ADN du VIH-1_(VAU), l'ADN total a été extrait de PBMC infectées par le VIH-1_(VAU) et un segment du gène *pol* (région intégrase) a été amplifié à l'aide d'amorces dégénérées :

30 amorce 4506 : 5'AGTGGAT(AT)(T/C)ATAGAAGCAGAAGT3'; Seq. ID N°1;
amorce 5011 : 5'ACTGC(C/T)CCTTC(A/C/T)CCTTTCCA3'; Seq. ID N°2;

Le milli u de réaction incluant KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,9), MgCl₂ 1,5 mM, gélatine 0,1 mg/ml, dNTP 0,2 mM, Taq Polymérase 1U (Amersham). La PCR a été effectuée pendant 43 cycles thermiques à 92°C pendant 10 secondes, 50°C pendant 1 minute, 72°C pendant 40 secondes.

Le produit d'amplification résultant a été cloné dans un vecteur pBluescript, engendrant le clone ph4 déposé à la CNCM le 20 octobre 1994 sous le n° I-1486 qui a ultérieurement été utilisé comme sonde pour cribler une banque lambda d'ADN de faible poids moléculaire, digéré par EcoRI, issu de cellules infectées par le VIH-1_(NAU). Brièvement, les PBMC infectées par le VIH-1_(NAU) ont été cocultivées pendant 24 heures avec des PBMC neuves stimulées à la PHA et épuisées en cellules CD8⁺, après quoi un effet cytopathogène poussé (ECP) était visible. L'ADN de faible poids moléculaire a alors été extrait suivant la méthode de Hirt (Hirt 1967), et digéré avec l'enzyme EcoRI. Une analyse précédente en Southern-blot précédente de cet ADN avait bien montré que le génome VIH-1_(NAU) contenait un seul site EcoRI, permettant le clonage d'espèces d'ADN circulaire non intégré représentant la totalité du génome viral. Le produit de digestion résultant a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose, et la population de fragments d'ADN d'une taille de 8-12 kb approximativement a été purifiée et ligaturée à de l'ADN lambda Zap digéré par EcoRI (Stratagene). Après l'encapsidation, l'étalement et le criblage par hybridation avec de l'ADN ph4 marqué au ³²P, un clone, λ H34, a été identifié comme étant positif, et amplifié. L'inserat EcoRI a été purifié, soniqué, et cloné par "shotgun" dans le vecteur M13mp18 traité à la phosphatase, digéré avec l'enzyme SmaI. Cent cinquante des clones obtenus ont été séquencés sur un séquenceur d'ADN 373A (Applied Biosystems), et les séquences résultantes ont été rassemblées en une seule séquence à l'aide du progiciel d'analyse d'ADN GCG-Wisconsin.

L'analyse de cette séquence a révélé de nombreux codons non-sens dans tous les cadres de lecture, ce qui est très suggestif d'un génome hypermuté (Vartanian, et al. 1991). Cette séquence étant inutilisable, il a par conséquent été décidé d'amplifier par la PCR le gène *env* du VIH-1_(VAU) à l'aide de l'ADN total de PBMC infectées par le VIH-1_(VAU), et des amorces oligonucléotidiques dérivées de la séquence λ H34 :
amorce TH2 5'GCTCTAGATGGGGATCTCCCATGGCAGG3' Seq. ID N° 3;
amorce UH2 5'GCTCTAGATCAGGGAAGAATCCCTGAGTGT3'. Seq. ID N° 4.

L'amplification par la PCR a été effectuée pendant 35 cycles thermiques à 92°C pendant 15 secondes, 52°C pendant 1 minute, 60°C pendant 2 minutes et 72°C pendant 2 minutes. Le produit d'amplification résultant, d'une taille de 3,5 kb, a été cloné dans le vecteur M13mp18 et séquencé par réactions successives, en utilisant d'abord l'amorce universelle de séquençage M13, puis des amorces déduites des séquences amont. L'analyse des séquences nucléotidiques et peptidiques a été effectuée à l'aide du progiciel d'analyse d'ADN GCG-Wisconsin. Le gène *env* VIH-1_(VAU) code 877 acides aminés au total, incluant le peptide signal. La séquence nucléotidique du gène *env* VIH-1_(VAU) correspond à la Seq. ID N° 5 (voir figure 3).

Utilisation d'acides nucléiques à titre de sondes

L'invention concerne naturellement aussi l'utilisation des ADN, ADN_c ou de leurs fragments, ou de plasmides recombinants ou autres vecteurs équivalents contenant ces fragments, en tant que sondes, pour la détection de la présence ou non du virus VIH-1_(VAU) dans des échantillons de sérum ou autres liquides ou tissus biologiques obtenus à partir de patients suspectés d'être porteurs du virus VIH-1_(VAU). Ces sondes sont éventuellement marquées (marqueurs radioactifs, enzymatiques, fluorescents, etc.). Des sondes particulièrement intéressantes pour la mise en oeuvre du procédé de détection du virus VIH-1_(VAU) ou d'un variant VIH-

1_(VAU) peuvent être caractérisées en ce qu'elles comprennent la totalité ou une fraction de l'ADN complémentaire du génome du virus VIH-1_(VAU) ou encore notamment les fragments contenus dans divers clones. On mentionnera plus particulièrement une fraction de l'ADN_c du VIH-1_(VAU) contenant tout ou partie de la région *env*.

Les sondes mises en oeuvre dans ce procédé de détection du virus VIH-1_(VAU) ou dans des trousse de diagnostic, ne sont en aucune façon limitées aux sondes décrites précédemment. Elles comprennent toutes les séquences nucléotidiques issues du génome du virus VIH-1_(VAU), d'un variant VIH-1_(VAU) ou d'un virus proche par sa structure, dès lors qu'elles permettent la détection, à partir de fluides biologiques de personnes susceptibles de présenter un sida, d'un virus VIH-1 du groupe O, en particulier VIH-1_(VAU) par hybridation avec de l'ADN ou de l'ARN du virus VIH-1_(VAU).

Particulièrement avantageuses sont les sondes qui, lors de l'hybridation avec VIH-1, donnent une réaction forte avec les HIV appartenant au groupe O et une réaction faible avec les VIH-1 appartenant au groupe M. A titre d'exemple non limitatif, une sonde fabriquée à partir de la séquence du gène de l'intégrase du virus VIH-1_(VAU) (SEQ ID N° 7) donne, lorsqu'elle est hybridée avec VIH-1 dans des conditions d'hybridation telles que celles décrites dans le brevet EP 178 978, une réaction forte avec les HIV du groupe O et une réaction faible avec les VIH-1 du groupe M.

La détection peut être réalisée de toute façon en soi connue, notamment :

par une mise en contact de ces sondes soit avec les acides nucléiques obtenus à partir de cellules contenues dans des fluides biologiques (par exemple liquide céphalo-rachidien, salive, etc.), soit avec ces fluides eux-mêmes, dès lors que leurs acides nucléiques ont été rendus accessibles à l'hybridation avec ces sondes, et ce dans des

conditions permettant l'hybridation entre ces sondes et ces acides nucléiques

et par une détection de l'hybridation éventuellement produite.

Le susdit diagnostic mettant en jeu des réactions d'hybridation peut également être réalisé à l'aide de mélanges de sondes respectivement dérivées du VIH-1_{VAU}, du VIH-1 et du VIH-2, dès lors qu'il n'est pas nécessaire de faire la distinction entre les types de virus HIV recherchés.

L'invention a aussi pour objet des vecteurs d'expression contenant la séquence codant pour les protéines d'enveloppe de VIH-1 ou contenant la séquence codant l'intégrase.

L'invention comprend des compositions pour la détection de la présence ou non de virus VIH-1_{VAU} dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides ou tissus biologiques, obtenus à partir de patients susceptibles d'être porteurs du virus VIH-1_{VAU}. Ces compositions sont caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue ou dérivée du génome du virus VIH-1_{VAU}, particulièrement un fragment d'ADN VIH-1_{VAU} contenant la région ou une partie de la région codant la protéine *env* du virus VIH-1_{VAU} ou d'un variant de VIH-1_{VAU}.

Avantageusement, la composition décrite ci-dessus comprend également une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue de VIH-1 ou de VIH-2.

D'autres compositions de diagnostic comprennent les amorces de l'invention utilisables en amplification génique de rétrovirus de sous-groupe O ou variants de ces rétrovirus.

Antigènes, notamment protéines et glycoprotéines

L'invention concerne une protéine de rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ou polypeptide ou peptide naturel ou synthétique

comprenant au moins une partie de ladite protéine, susceptibles d'être reconnus par des anticorps isolables à partir de sérum obtenu suite à une infection par une souche VIH-1 groupe O VAU, ou une souche VIH-1 groupe O DUR.

5 L'invention concerne une protéine d'enveloppe externe du rétrovirus VIH-1_{VAU} codée par le gène comprenant la séquence correspondant à la SEQ ID N° 5. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, cette protéine est en outre caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence d'acides aminés correspondant à la Seq ID N° 6 représentée
10 sur la figure 3 et comportant les résidus d'acides aminés 1 à 526. L'invention a aussi pour objet tout polypeptide ou variant, dérivé de ladite séquence, ayant un épitope susceptible d'être reconnu par des anticorps induits par le virus VIH-1_{VAU}.

15 La susdite protéine peut être obtenue sous forme glycosylée ou non glycosylée.

L'invention a aussi pour objet une protéine transmembranaire d'enveloppe comprenant l'enchaînement d'acides aminés SEQ ID N° 8 représenté sur la figure 3 entre les résidus d'acides aminés 527 et 877. Cette protéine transmembranaire est, dans le cadre de l'invention, sous
20 forme glycosylée ou non.

L'invention concerne tous les antigènes, notamment protéines, glycoprotéines, polypeptides ou peptides, obtenus par expression de séquences codantes du génome VIH-1_{VAU} et ayant des propriétés immunologiques équivalentes à ceux ou celles du VIH-1_{VAU}.
25 Les antigènes sont dits équivalents dans le cadre de la présente invention, dès lors qu'ils sont reconnaissables par les mêmes anticorps, notamment des anticorps isolables à partir de sérum obtenu d'un patient ayant été infecté par un VIH-1_{VAU}.

30 En particulier, l'invention a pour objet les peptides ou polypeptides synthétisés chimiquement et dont la séquence d'acides

aminée est contenue dans celle des protéines d'enveloppe VIH-1_(NAU), représentée sur la figure 3, ou les peptides ou polypeptides équivalents.

On doit aussi inclure, parmi les peptides, polypeptides, protéines ou glycoprotéines équivalents, les fragments des antigènes qui précèdent et les peptides préparés par synthèse chimique ou par génie génétique, dès lors qu'ils donnent lieu à des réactions immunologiques croisées avec les antigènes dont ils sont dérivés. En d'autres termes, l'invention concerne tout peptide ou polypeptide ayant des épitopes identiques ou semblables aux épitopes des susdits antigènes, susceptibles d'être reconnus par les mêmes anticorps. Font partie de ce dernier type de polypeptides, les produits d'expression de séquences d'ADN correspondant aux séquences des ADN codant les polypeptides ou antigènes susdits.

Plus particulièrement, les antigènes obtenus à partir du virus VIH-1_(NAU) ou produits par génie génétique ou synthèse chimique classique et qui présentent le plus grand intérêt dans le contexte de la présente invention sont les antigènes qui permettent d'établir une distinction claire entre les virus VIH-1_(NAU) de l'invention et les virus des groupes VIH-1 et VIH-2. A cet égard, des différences considérables ont été observées au niveau de la protéine d'enveloppe du virus VIH-1_(NAU) ainsi qu'au niveau de l'épitope immunodominant de la portion externe de la protéine PM. Il semble que les protéines gag et pol présentent davantage de similitude avec le virus VIH-1 que la protéine d'enveloppe.

L'invention concerne aussi des peptides ou polypeptides identiques à la région immunodominante de la glycoprotéine transmembranaire d'enveloppe du VIH-1_(NAU). Cette région est représentée à la figure 3.

Dés polypeptides préférés de cette région sont par exemple ceux qui contiennent la séquence CKNRLIC ou correspondent à cette séquence. Il peut s'agir aussi de polypeptides ou peptides répondant à la

séquence RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC ou comprenant cette séquence.

Un autre peptide préféré, identifié ci-après par la dénomination « peptide VAU », répond à la séquence suivante ou comprend cette séquence ou toute partie de cette séquence susceptible d'être reconnue par des anticorps dirigés contre le rétrovirus VIH-1_(VAU) RARLLALETFIQNQQLLNWLWGCKNRLICYTSVKWNKT.

Des polypeptides variants de cette séquence sont par exemple les polypeptides représentés sur la figure 4 pour les isolats VIH-1_(MVP5180) et VIH-1_(am70). Ces polypeptides peuvent aussi être dérivés des précédents par insertion et/ou délétion et/ou substitution, par exemple substitution conservative par des résidus d'acides aminés.

La présente invention concerne un peptide issu du virus VIH-1-O DUR déposé le 23 février 1995 à la CNCM sous la référence I-1542, ou un peptide dont la séquence se distingue de celle du précédent par substitution, délétion ou addition d'acides aminés, ce peptide distinct conservant néanmoins les caractéristiques antigéniques du précédent.

D'autres peptides entrant dans le cadre de l'invention sont définis ci-après.

Ainsi, un peptide préféré de l'invention est un peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs contenus dans la séquence GAG représentée à la figure 8 ou d'une séquence GAG immunologiquement semblable issue d'un variant du virus VIH-1-O DUR, ladite séquence immunologiquement semblable étant reconnue par des anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des séquences AHPQQA, LWTTRAGNP contenues dans la séquence GAG de la figure 8.

Préférentiellement, ce peptide consiste en un peptide dont la séquence en acides aminés est contenue soit dans l'une des séquences suivantes :

SPRTLNAWVKAVEEKAFNPEIIPMFMALEGA (1)

MLNAIGGHQ GALQVLKEVIN (2).

GPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQI (3)

IPVGDIYRKWIVLGLNKMVKMYSILDI (4)

QGPKEPFRDYVDRFYKTKLAE (5)

5 AHPQQA (5 bis)

LWTTRAGNP (5ter),

soit dans une séquence immunologiquement semblable
correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés
consécutifs de l'une desdites séquences.

10

Préférentiellement encore, ce peptide consiste en un peptide
dont la séquence en acides aminés est contenue soit dans l'une des
séquences suivantes :

SPRTLNAWVK (6)

15 GSDIAGTTST (7)

QGPKEPFRDYVDRF (8)

soit dans une séquence immunologiquement semblable
correspondante, ce peptide comportant au moins quatre acides aminés
consécutifs de l'une desdites séquences.

20

Des peptides particulièrement préférés dans la présente
invention sont les peptides contenant ;

25 - la séquence en acides aminés NPEI (9)

ou

- la séquence en acides aminés AVEEKAFNPEIIPMFM (10), et plus
particulièrement les peptides dont la séquence en acides aminés est
contenue, soit dans l'une des séquences suivantes :

30 IGGHQ GALQ (23)

REPTGSDI (24)

soit dans une séquence immulogiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs de l'une desdites séquences, ainsi que le peptide dont la séquence en acides aminés est contenue, dans la séquence d'acide aminés suivante :

INDEAADWD (25)

soit dans une séquence immulogiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs de ladite séquence.

La présente invention concerne les séquences d'acides nucléiques codant les peptides (23), (24) et (25) ainsi que les séquences d'acides nucléiques codant les séquences immunologiquement semblables ainsi que les compositions comprenant au moins un de ces acides nucléiques.

L'invention concerne également l'utilisation d'au moins un de ces acides nucléiques pour la détection et la discrimination entre des souches VIH-1 groupe M et HIV-1 groupe O.

Entre également dans le cadre de la présente invention un peptide issu du virus VIH-1-O DUR défini ci-dessus, ledit peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs, de la boucle V3 de gp120 représentée à la figure 9 ou de la séquence correspondante immunologiquement semblable, issue d'un variant du virus VIH-1-O DUR, ladite séquence immunologiquement semblable étant reconnue par des anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des séquences :

KEIKI (12),

EREGKGAN (13).

CVRPGNNSVKEIKI (14),

QIEREGKGANSR (15).

De façon préférée, ce peptide contient :

a) soit la séquence

CVRPGNNSVKEIKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAFC (11) ou une partie de cette séquence qui contienne au moins 4 acides aminés

5 b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par un ou plusieurs acides aminés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le susdit peptide,

10 c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

d) soit une séquence ou partie de séquence immunologiquement semblable correspondante.

15 Préférentiellement encore, ce peptide contient soit la séquence KEIKI (12),

soit

la séquence EREGKGAN (13),

soit

20 la séquence GPMWYYSM (16).

25 De façon particulièrement préférée, un peptide comme défini ci-dessus contient la séquence d'acides aminés CVRPGNNSVKEIKI (14), soit la séquence QIEREGKGANSR (15).

30 Entre également dans le cadre de l'invention un peptide issu du virus VIH-1-O DUR tel qu'il est défini ci-dessus, ledit peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs, dont la séquence entière est contenue dans la séquence de la région immunodominante de la gp41 représentée à la figure 9 ou dans une séquence correspondante immunologiquement semblable, issue d'un variant du virus VIH-1-O DUR,

ladite séquence immunologique ment semblable étant reconnue par d s anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des séquences :

5 RLLALETLMQNQQL (17),

U III - LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18),

CRGKAI (19),

SVQWN (20),

RLLALETLMQNQQLNLWGCRGKAICYTS (21),

QNQQLLNLDWGCRGKAICYTSVQWN (22).

10 De façon préférée, ce peptide est un peptide contenant la séquence RLLALETLMQNQQL (17), ou LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18) ou partie de ce peptide (18) contenant :

15 a) soit la séquence CRGKAI (19), soit la séquence SVQWN (20) dans laquelle Q est le cas échéant remplacé par un acide aminé différent, néanmoins différent aussi de K, soit les deux séquences à la fois,

20 b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par deux acides aminés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

25 c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

d) soit dans une séquence ou partie de séquence immunologiquement semblable correspondante.

30 Préférentiellement encore, ce peptide possède l'une ou l'autre des caractéristiques suivantes :

- sa séquence N terminale, qui contient au moins 8 acides aminés, n'est pas immunologiquement reconnue par des anticorps formés contre la séquence RILIVERY contenue dans la région immunodominante de la gp41 de la souche VIH-1-LAI.

5 - il n'est pas reconnu par des anticorps formés contre le peptide SGKLIC de la souche VIH-1-LAI.

- il contient l'une ou l'autre des deux séquences suivantes :

RLLALETLMONQQLLNWGCGRGKAICYTS (21)

QNQQLLNWGCGRGKAICYTSVQWN (22)

10 Synthèse de peptides VAU

Un peptide VAU a été préparé par la technique classique de synthèse peptidique en phase solide par la méthode Fmoc en « flux continu ». Le peptide a été préparé à l'aide d'un synthétiseur Milligen 9050 PEP en utilisant la résine "Millipore" PEG PAL, substituée par le premier
15 résidu d'acide aminé C-terminal. Les chaînes latérales des acides aminés sont protégées par les groupes suivants : Pmc pour l'arginine ; Trt pour l'asparagine, la glutamine et la cystéine ; Boc pour la lysine ; tBu ester pour l'acide glutamique ; tBu éther pour la sérine, la thréonine et la tyrosine. Les groupements temporaires Fmoc sont éliminés par une
20 solution de pipéridine à 20% en DMF. Les réactions de couplage de chaque acide aminé sont réalisées avec 6 équivalents de DIPCDI et d'HOBT. Certains résidus nécessitent un double couplage notamment les arginines 1 et 23, les cystéines 19 et 26, l'asparagine 11, les glutamines 10, 12 et 13, l'alanine 4, l'isoleucine 9, les leucines 2, 3, 14 et 15.

Après couplage, la résine est séchée sous vide. Le peptide est clivé du support par le réactif K pendant 4 heures à température ambiante. Le peptide brut est précipité et lavé à l'éther éthylique. Le produit est purifié par chromatographie liquide sous haute pression (HPLC)
30 sur un instrument WATERS LC PREP 4000 avec des cartouches WATERS Delta Pak C18 40x100mm, débit 30 ml/mn, gradient acétonitrile/TFA 0,1%.

Les fractions contenant le peptide sont rassemblées, concentrées à l'évaporateur rotatif puis lyophilisées.

Cyclisation

5 Le peptide (0,025mM) est dissous dans une solution d'acétate d'ammonium 10mM. Le pH est amené à 8,5 avec une solution d'ammoniaque 1M. Le pH est réajusté après 3 ou 4 heures. La cyclisation est suivie par HPLC à 214 nm et 280 nm, colonne WATERS Delta Pak C18 5µ, gradient acétonitrile/TFA 0,1%. La cyclisation est terminée au bout de
10 15 heures. Le pH est amené à 6 à l'aide d'acide acétique 97-100%, la solution est lyophilisée puis purifiée dans les mêmes conditions que pour le peptide brut.

Le peptide est contrôlé par HPLC et par spectrométrie de masse selon la technique d'électrospray (spectrophotomètre FISON VG
15 Trio 2000).

Fmoc : Fluoroenyl-9 methyloxycarbonyl

Pmc : Pentanemethyl-8 chromane sulfonyl-6

Trt : Tritryl

Boc : Tertbutyloxycarbonyl

20 tBU : tert butyl

DMF : Dimethylformamide

DIPCDI : Diisopropyl carbodiimide

HOBT : Hydroxy-1 benzotriazole

TFA : acide trifluoroacétique

25 Réactif K : Phénol/Eau/Thioanisole/Ethanedithiol/TFA;

2,5ml/2,5ml/2,5ml/1,5ml/41ml

Comparaison de la séquence d'acides aminés de l'enveloppe VIH-1_(VAU) avec la séquence correspondante d'autres virus HIV.

30 L'analyse en Western-blot d'une série d'échantillons sériques provenant d'une patiente infectée par le VIH-1_(VAU) est présentée sur la

figur 2. Des bandelettes de nitrocellulose, portant des protéines séparées par électrophorèse et provenant de particules de HIV purifiées (LAV BLOT, SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR), ont été mises à incuber avec des échantillons de sérum et leur réactivité a été évaluée selon les protocoles recommandés par le fabricant. Les résultats obtenus sont les suivants :

5 Bandelette 1 : protéines spécifiques de VIH-2, qu'on a fait réagir avec un échantillon de sérum de la patiente VIH-1_(VAU) obtenu en février 1992.

10 Bandelettes 2-7 : sérums positifs VIH-1 ; sérums de la patiente VIH-1_(VAU) : 2: obtenu en novembre 1990; 3 : en décembre 1990; 4 : en février 1991; 5 : en février 1992; 6 : témoin négatif; 7 : témoin positif (sérum d'un individu infecté par le VIH-1). Les noms et la taille des protéines (en kD) sont indiqués dans la marge.

La figure 3 montre un alignement de la séquence d'acides aminés de l'enveloppe de VIH-1_(VAU) avec la séquence correspondante de l'isolat de référence VIH-1 LAI (Wain-Hobson, et al. 1985). Les peptides signal, la boucle V3 et l'épitope immunodominant gp41 sont mis en relief par des rectangles hachurés. Le site de clivage entre la glycoprotéine d'enveloppe externe gp120 et la gp41 transmembranaire est indiqué par des flèches. Les lignes verticales entre les lettres d'acides aminés indiquent une identité complète, les deux-points (:) indiquent une forte homologie, et les points (.) indiquent une homologie limitée entre des acides aminés individuels. L'alignement a été effectué en utilisant le programme GAP du progiciel GCG-Wisconsin.

15

20

La version originale (1.0) des programmes GAP et BESTFIT a été écrite par Paul Haeberli à partir d'une étude détaillée des publications de Needleman et Vunsch (J. Mol. biol. 48, 443-453 (1970) et de Smith et Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981). Les alignements limités ont été mis au point par Paul Haeberli et ajoutés au progiciel pour constituer la version 3.0. Ils ont ensuite été fusionnés en un seul programme par Philip Marquess pour constituer la version 4.0. Les pénalités d'absence d'écart dans l'alignement des protéines ont été

25

30

modifiées t l que suggéré par R chid, Vingron et Argos (CABIOS 5 ; 107-113 (1989).

L'alignement de la figure 3 révèle de nombreuses zones de divergence poussée, avec quelques domaines conservés çà et là. Ces régions conservées correspondent grossièrement aux domaines également conservés dans les isolats VIH-1 classiques (Alizon, et al. 1986, Benn, et al. 1985). Parmi les domaines divergents, la boucle V3, appelée également déterminant principal de neutralisation (Javaherian, et al. 1990, Javaherian, et al. 1989, Matsushita, et al. 1988) est clairement l'un des plus divergents, bien que les deux cystéines définissant la boucle soient conservées. La séquence de la coiffe de la boucle, GPGRAF pour le VIH-1 LAI est GPMAYWY chez le VIH-1_(MAU). Ce motif de la coiffe est identique à celui de l'isolat du groupe O camerounais HIV_{ANT70} (Van den Heasevelde, et al. 1994), mais est différent de celui de l'autre isolat du groupe O, HIV_{MVPS180} (Gürtler, et al. 1994), pour lequel le motif est GPMRWR.

Dans l'ensemble de l'enveloppe, 29 sites de N-glycosylation potentiels ont été identifiés au total, dont 13 sont conservés comparativement à d'autres protéines d'enveloppe VIH-1. On a également trouvé 19 cystéines conservées au total, ce qui indique que l'architecture globale de repliement de la protéine est conservée, mais on a trouvé 5 cystéines non conservées.

La figure 4 montre l'alignement multiple des peptides immunodominants dans le segment extracellulaire de la glycoprotéine d'enveloppe transmembranaire de différents isolats VIH-1. Toutes les séquences sont comparées à la séquence de référence VIH-1LAI. Des traits d'union indiquent une identité au VIH-1LAI. L'alignement a été effectué à l'aide du programme PILEUP du progiciel GCG-Wisconsin.

Dans le programme PILEUP, la stratégie de rassemblement représentée par le dendrogramme est nommée UPGMA, qui signifie en anglais « Unweighted pair-group method using arithmetic averages » (Smith, P.H.A. Sokal, R.R. (1973) dans Numerical Taxonomy (p.p. 230-

234), W.H. Freeman and Company, San Francisco, California, USA).
Chaque alignement en pair de PILEVP utilise la méthode de Needleman et Wunsch (Journal of Molecular Biology 48 ; 443-453 (1970)).

5 Comme le montre la figure 4, la séquence d'acides aminés de l'épitope immunodominant de la portion extérieure de la protéine TM (Gnann, et al. 1987) est sensiblement différente de celle d'autres isolats VIH-1 et VIH-2. Toutefois, elle a gardé la plupart des acides aminés qui se sont révélés conservés entre les virus VIH-1 et VIH-2.

10 On a trouvé que certains acides aminés particuliers n'étaient conservés qu'entre les virus du groupe O : tel est le cas de la lysine en position 21 sur un peptide de 26 acides aminés, de la thréonine en position 7 et de l'asparagine en position 11. Ces différences pourraient expliquer l'absence de détection d'antigènes d'enveloppe VIH-1 classiques par un des sérums de la patiente VIH-1_(VAU) et également probablement par celui
15 de patients infectés par d'autres virus de groupe O. Globalement, la comparaison entre les séquences d'enveloppe VIH-1 LAI et VIH-1_(VAU) a montré une identité de 50 %. La séquence d'enveloppe VIH-1_(VAU) a également été comparée à celle d'autres représentants HIV dont les deux membres du groupe O du VIH-1 décrits et séquencés : VIH-1_{ANT70} et VIH-1_{MVP3180}, et SIV. Les résultats de cette analyse, présentés sur le Tableau 1,
20 établissent que le VIH-1_(VAU) appartient au groupe O. L'enveloppe VIH-1_(VAU) est identique à 70 % à l'enveloppe VIH-1_{ANT70} et identique à 71 % à VIH-1_{MVP3180}. Parmi les sous-types VIH-1 les plus courants, l'identité au niveau de l'enveloppe est comparable, allant de 74 % à 80 %.

[illegible]

La relation entre le VIH-1_(VAU), d'autres membres de la phylogénie des VIH-1 et les deux virus récemment décrits du groupe O a été analysée par construction d'un arbre phylogénétique de parcimonie non pondérée à l'aide de la séquence nucléotidique de la région transmembranaire *env*. Le résultat de cette analyse est représenté sur la fig. 5 dans laquelle les nombres indiquent le nombre de changements nucléotidiques. La figure 5 montre que le VIH-1_(VAU) est à peu près équidistant des deux autres virus du groupe O, et que, globalement, ces trois virus semblent être approximativement équidistants les uns des autres. En effet, le nombre de changements nucléotidiques entre le VIH-1_{MVPS180} et le VIH-1_(VAU) est de 218 dans le segment de génome analysé, alors que la distance est de 183 entre le VIH-1_{MVPS180} et le VIH-1_{ANT70}, et de 213 entre le VIH-1_{ANT70} et le VIH-1_(VAU). Ce profil de divergence est très similaire à ce qu'on trouve dans l'ensemble des autres sous-types VIH-1, où le nombre de changements nucléotidiques uniques que l'on trouve entre deux sous-types distincts va de 157 (sous-type E au sous-type F) à 219 (sous-type A au sous-type D).

Le tableau 1 montre la comparaison des séquences d'enveloppe de différents virus apparentés au VIH-1. Les nombres indiquent le pourcentage d'identité en acides aminés entre des séquences d'enveloppe, tels qu'ils ont été calculés à l'aide du programme GAP du progiciel GCG-Wisconsin. * : pour le HIV_{ANT70}, seule la protéine d'enveloppe externe a été utilisée dans la comparaison.

25 Compositions comprenant des antigènes VIH-1_(VAU)

De façon générale, l'invention concerne toute composition utilisable en détection in vitro de la présence dans un fluide biologique, notamment de personnes ayant été mises au contact du VIH-1_(VAU), ou d'anticorps contre l'un au moins des antigènes VIH-1_(VAU). Cette composition peut être appliquée au diagnostic sélectif de l'infection par un

VIH-1 du groupe O, en mettant en oeuvre des techniques de diagnostic telles qu'elles sont décrites dans les demandes de brevet EP 84401.834 et EP 87400.151.4. Dans le contexte de la présente invention, on utilise tout constituant comprenant des déterminants antigéniques capables d'être reconnus par des anticorps produits contre le VIH-1_(NAU), par exemple des antigènes ou peptides recombinants ou peptides synthétisés chimiquement définis à partir de la séquence de l'enveloppe VIH-1_(NAU). A cet égard, l'invention concerne plus particulièrement des compositions contenant l'une au moins des protéines d'enveloppe du virus VIH-1_(NAU). On mentionnera, à titre d'exemples de compositions, celles qui contiennent des protéines, glycoprotéines ou peptides de la protéine d'enveloppe correspondant à l'ensemble de la région 590-620 de la protéine gp41 du VIH-1_(NAU), ou aux parties de cette région spécifiques du VIH-1_(NAU) tels que les peptides -TFIQN- ou -WGCKNR-.

L'invention concerne également des compositions associant des protéines et/ou glycoprotéines et/ou peptides VIH-1_(NAU), recombinants ou synthétiques, avec des protéines et/ou glycoprotéines et/ou peptides VIH-1 et/ou VIH-2 et/ou d'un autre VIH-1 groupe O obtenus par extraction ou dans des lysats ou par recombinaison ou par synthèse chimique et/ou de peptides dérivés de ces protéines ou glycoprotéines et susceptibles d'être reconnus par des anticorps induits par le virus VIH-1 et/ou VIH-2 et/ou VIH-1, groupe O.

Les compositions diagnostiques contenant des déterminants antigéniques capables d'être reconnus par des anticorps dirigés contre le VIH-1_(NAU), en particulier les compositions peptidiques, peuvent être incluses dans ou associées à des compositions ou des trousse déjà disponibles pour la détection de l'infection par des rétrovirus VIH-1 et/ou VIH-2, de façon à étendre le spectre de détection des trousse à la détection des rétrovirus VIH-1 du groupe O.

A titre d'exemples non limitatifs :

- soit des protéines du noyau (cor), particulièrement les protéines gag, pol, VIH-1 et VIH-2 ou des peptides de cell s-ci, et des protéines ou peptides d'enveloppe VIH-1_(VAU),

- soit des glycoprotéines d'enveloppe VIH-1, des glycoprotéines d'enveloppe VIH-2 et des glycoprotéines d'enveloppe VIH-1_(VAU),

- soit des mélanges de protéines et/ou glycoprotéines VIH-1, de protéines et/ou glycoprotéines VIH-2 et de protéines et/ou glycoprotéines d'enveloppe VIH-1_(VAU).

Il est important de noter que, bien que les anticorps de patients infectés par des virus VIH-1 groupe O réagissent fortement avec des antigènes gag et pol de virus VIH-1 groupe M, leur réactivité est pratiquement nulle avec des antigènes d'enveloppe de virus du groupe M. Il est donc important que la composition de la présente invention comprenne au moins une protéine ou un peptide d'enveloppe VIH-1_(VAU) de façon à ce que ce virus puisse être détecté avec certitude.

De telles compositions, utilisées en diagnostic, aident par conséquent au diagnostic du sida ou des symptômes qui lui sont associés, qui s'étendent sur un plus large spectre des agents étiologiques responsables. Il va sans dire que l'utilisation de compositions de diagnostic qui ne contiennent que des protéines et/ou glycoprotéines d'enveloppe VIH-1_(VAU) n'en reste pas moins utile pour la détection plus sélective de la catégorie de rétrovirus qui peut être tenue pour responsable de la maladie.

Procédés et trousse de diagnostic d'infections causées notamment par le virus VIH-1_(VAU)

La présente invention concerne un procédé de diagnostic in vitro de l'infection par les HIV, agents étiologiques du SIDA et de syndromes apparentés, qui comprend la mise en contact d'un sérum ou d'un autre mili u biologique, provenant d'un patient ou sujet faisant l'objet

du diagnostic, avec une composition contenant au moins une protéine, une glycoprotéine ou un peptide VIH-1_(VAV), et la détction d'une réaction immunologique éventuelle. Des exemples de telles compositions ont été décrits plus haut.

Des méthodes préférées mettent en jeu, par exemple, des réactions immunoenzymatiques de type ELISA ou d'immunofluorescence. Les détections peuvent se faire par immunofluorescence directe ou indirecte ou des dosages immunoenzymatiques directs ou indirects.

De telles détections comprennent par exemple :

- le dépôt de quantités déterminées de l'extrait ou des compositions antigéniques visées conformes à la présente invention dans les puits d'une microplaque ;

- l'introduction dans chaque puits d'un sérum dilué ou non, susceptible de contenir les anticorps dont la présence doit être détectée in vitro ;

- l'incubation de la microplaque ;

- le lavage soigneux de la microplaque avec un tampon approprié ;

- l'introduction dans les puits de la microplaque d'anticorps marqués spécifiques anti-immunoglobuline humaine, le marquage étant réalisé par une enzyme choisie parmi celles qui sont capables d'hydrolyser un substrat de telle sorte que ce dernier subit alors une modification de son absorption des radiations, au moins dans une bande de longueur d'onde déterminée, et

- la détection, de préférence de façon comparative par rapport à un témoin, de l'importance de l'hydrolyse du substrat en tant que mesure des risques potentiels ou de la présence effective de l'infection.

La présente invention est également relative à des nécessaires ou trousse de diagnostic de l'infection par le virus VIH-1_(VAV), lesquels comprennent notamment :

- un extrait, une fraction plus purifiée, ou un antigène synthétique dérivé des types de virus indiqués ci-dessus, cet extrait fraction ou antigène marqué, par exemple, de façon radioactive, enzymatique, fluorescente ou autre,

5 - des anticorps antiimmunoglobulines humaines ou une protéine A (fixés de façon avantageuse sur un support insoluble dans l'eau) telles que des billes par exemple d'agarose) ou des puits de microplaque, etc.),

10 - éventuellement un échantillon de fluide biologique ou cellules obtenu à partir d'un sujet témoin négatif ;

- des tampons et, le cas échéant, des substrats pour la visualisation du marquage.

15 L'invention a aussi pour objet des compositions immunogènes capables d'induire la formation d'anticorps reconnaissant des antigènes pouvant être obtenus par synthèse chimique ou par recombinaison.

Sérologie

20 La capacité des anticorps sériques de la patiente infectée par le VIH-1_(VAL) à réagir avec des préparations antigéniques VIH-1 a été évalué à l'aide de diverses trousse disponibles dans le commerce : SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, (GENELAVIA MIXT) ABBOTT, WELLCOME, et BEHRING. La réactivité de ces anticorps avec différentes protéines VIH-1 a été examinée à l'aide de la trousse de Western-blot de
25 SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, suivant les protocoles recommandés par le fabricant.

30 Plus précisément, le sérum de la patiente a été examiné plusieurs fois à l'aide de trousse ELISA spécifiques VIH-1. Il a d'abord été testé et s'est avéré être positif en 1990, étant noté 7,33 (ce chiffre correspond au rapport de la DO mesurée sur la DO du bruit de fond) avec la trousse de SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR, 3,50 avec la trousse

ABBOTT t 2,70 avec la trouss WELLCOME. Lors de l'utilisation des
r'actifs spécifiques à la fois du VIH-1 et du VIH-2, l sérum a été noté
1,42 avec la trousse Behring et 4,40 avec la trousse WELLCOME.

La capacité du sérum de la patiente à réagir à différentes
5 dates avec différentes protéines de structure VIH-1 a été étudié à l'aide
du dosage par immunoempreinte LAV BLOT VIH-1, test commercialisé
par SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR. Comme le montre la figure 5
avec tous les échantillons de sérum testés, on n'a remarqué qu'une très
faible réactivité du sérum avec les protéines *env* VIH-1 gp160 et gp120.
10 Toutefois, le sérum a réagi fortement avec les protéines *gag* du VIH-1 p55
(précurseur de *gag*) et p24 (CA), et avec les produits *pol* p66 (RT) et p34
(IN). En immunoempreinte VIH-2, on n'a détecté qu'une très faible
réactivité avec la p26 *gag*.

Ceci illustre que la détection d'anticorps spécifiques du
15 groupe O avec des trousses de diagnostic sérique disponibles dans le
commerce doit être soigneusement contrôlée. Bien que des anticorps
sériques de patients infectés par des virus du groupe O présentent de
fortes réactions croisées avec les antigènes *gag* et *pol* du groupe M, ils
présentent peu ou pas de réactions avec les antigènes d'enveloppe de
20 groupe M. On peut, par conséquent, supposer qu'une proportion
significative de ces patients pourrait ne pas être détectée lors de
l'utilisation de certaines trousses à base de réactifs antigéniques
d'enveloppe du groupe M. En effet, dans une étude préliminaire récente
de plusieurs sérums de patients infectés par le groupe O, il a été trouvé
25 que la capacité de détecter des anticorps spécifiques du groupe O était
très différente selon la trousse de détection utilisée (Loussert-Ajaka, I.,
Ly, T.D., Chaix, M.L., Ingrand, D., Saragosti, S., Courroucé, A.M., Brun-
Vézinet, F. and Simon, F. (1994). VIH-1/VIH-2 seronegativity in VIH-1
subtype O infected patients. *Lancet*. 343, 1393-1394.). Ceci implique
30 qu'une étude soignée et poussée de la réactivité d'un grand nombre de

sérums du groupe O avec toutes les trousse de diagnostic disponibles sur la march est nécessaire.

5 Compositions comprenant des anticorps polyclonaux ou monoclonaux préparés à partir des antigènes recombinants ou synthétiques du virus VIH-1_(VAU).

10 L'invention concerne un sérum susceptible d'être produit chez l'animal par inoculation à celui-ci du VIH-1_(VAU), particulièrement les épitopes antigéniques du VIH-1_(VAU) et plus particulièrement les épitopes antigéniques de la protéine d'enveloppe du virus VIH-1_(VAU). L'invention
15 concerne plus particulièrement les anticorps polyclonaux plus spécifiquement orientés contre chacun des antigènes, notamment protéines ou glycoprotéines du virus. Elle concerne aussi des anticorps monoclonaux produits par différentes techniques, ces anticorps
monoclonaux étant orientés respectivement plus spécifiquement contre les différentes protéines du VIH-1_(VAU), particulièrement les protéines d'enveloppe du VIH-1_(VAU).

20 Ces anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont utilisables dans différentes applications. On mentionnera essentiellement leur utilisation pour neutraliser les protéines correspondantes, voire inhiber l'infectivité du virus entier. Ils peuvent également être utilisés par exemple pour mettre en évidence les antigènes viraux dans les préparations biologiques ou pour réaliser des opérations de purification des protéines et/ou glycoprotéines correspondantes, par exemple lors de l'utilisation
25 dans des colonnes de chromatographie d'affinité.

A titre d'exemple, des anticorps anti-enveloppe ou des anticorps anti-gag sont des réactifs utilisables en diagnostic, en particulier pour la détection de particules VIH-1 groupe O par ELISA de capture d'antigène.

30 L'invention concerne des anticorps dirigés contre un ou des antigènes du virus VIH-1_(VAU) produits à partir de séquences d'acides

aminés du VIH-1_(VAU). Des techniques d'obtention d'anticorps à partir d'épitopes antigéniques semblables aux épitopes antigéniques du virus VIH-1_(VAU) de la présente invention ont été décrites précédemment.

La technique de préparation d'anticorps décrite dans la publication de ULMER et al., 1993 peut être utilisée par l'homme du métier pour préparer les anticorps de la présente invention, les modifications permettant d'adapter cette technique aux antigènes de la présente invention faisant partie des connaissances de l'homme du métier.

Etude de l'immunoréactivité du peptide vau

L'immunoréactivité du peptide vau a été vérifiée, après avoir préparé des plaques ELISA expérimentales, selon un protocole établi pour un test de screening des anticorps anti-HIV. Ce test repose sur la détection d'une phase solide préparée avec le peptide mimant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, isolat VAU. La mise en oeuvre du test a été calquée sur le protocole proposé par la trousse GENELAVIA® MIXT, avec les réactifs de cette trousse.

Les données expérimentales rassemblées dans les deux tableaux des figures 21 et 22 démontrent que :

a) les quatre sérums prélevés chez des patients contaminés par le virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O sont très réactifs sur le peptide vau ;

b) les dix sérums censés prélevés chez des patients contaminés par le virus VIH-1 (groupe ou sous-groupe) O, parmi les 19 sérums transmis par l'Institut Pasteur de Yacoundé sont également fortement réactifs sur ce même peptide ;

c) les sérums (4 échantillons) prélevés chez des sujets contaminés par le virus VIH-1 sous-type B (en phase aiguë) ne sont pas réactifs sur le peptide vau ;

d) les sérums prélevés chez des donneurs de sang asymptomatiques (48 échantillons testés) ne sont pas réactifs sur le peptide vau ; Ces données expérimentales, bien que limitées (vu la paucité des échantillons positifs en anticorps VIH-1 groupe (ou sous-
5 groupe 0) attestent de la sensibilité et de la spécificité du peptide sélectionné.

De ce qui précède, il résulte que l'invention concerne aussi la détection du virus VIH-1_(vau) ou d'un variant grâce à la mise en oeuvre des anticorps décrits précédemment dans un procédé faisant appel à
10 différentes étapes, ces étapes étant spécifiquement prévues pour faire apparaître les propriétés caractéristiques du virus VIH-1_(vau).

L'invention concerne aussi la détection du virus VIH-1_(vau) par hybridation moléculaire.

D'une façon générale, ce procédé de détection du virus VIH-
15 1_(vau) ou d'un variant dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides biologiques ou tissus, obtenus à partir de patients susceptibles d'être porteurs du virus VIH-1_(vau) comprend les étapes suivantes :

- la fabrication d'au moins une sonde éventuellement marquée ;
- 20 - au moins une étape d'hybridation conduite dans des conditions permettant l'hybridation par mise en contact de l'acide nucléique de l'échantillon du patient suspect avec ladite sonde marquée et éventuelle immobilisation du complexe formé sur un support solide approprié,
- 25 - le cas échéant lavage dudit support solide avec une solution de lavage adéquate,
- la détection dudit complexe et donc de la présence ou non du virus VIH-1_(vau) par méthode appropriée de détection connue de l'homme du métier.

30 Dans un autre mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, l'hybridation précitée est conduite dans des conditions non

stringentes et le lavage du support (membrane) est réalisé dans des conditions adaptées à celles de l'hybridation.

En utilisant une sérologie ou une technique d'amplification génique telle que la Polymerase Chain Reaction (PCR) spécifique, l'importance de l'épidémie VIH-1 du groupe O a été évaluée précisément. Il a été trouvé que 5 à 10 % de patients infectés par un VIH-1 au Cameroun sont en réalité infectés par des virus du groupe O. Toutefois, à part l'isolat de virus décrit ici, la propagation de virus du groupe O en dehors de l'Afrique de l'Ouest Centrale n'a pas été documentée. La patiente chez qui le VIH-1_(NAB) a été isolé a toujours vécu en France et n'a jamais voyagé en Afrique. Jusqu'ici, nous n'avons aucune preuve précise concernant l'origine de son infection, mais ce cas indique qu'une certaine propagation des virus du groupe O en Europe s'est déjà produite.

L'invention concerne en outre un procédé de détection et de discrimination dans un échantillon biologique entre des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus du type VIH-1-M caractérisé par la mise en contact de cet échantillon biologique avec un peptide ne réagissant pas aux anticorps caractéristiques d'un rétrovirus du type VIH-1-M, notamment un choisi parmi les peptides (1), (2), (3), (4), (5bis), (5ter), (9) et (10) ci-dessus décrits.

Egalement, l'invention concerne un procédé de détection et de discrimination dans un échantillon biologique entre des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus du type VIH-1-M caractérisé par la mise en contact de cet échantillon biologique avec le peptide issu de l'un des virus VIH-1 M pris en considération dans les figures 8 et 9 homologue d'un peptide choisi parmi les peptides (1), (2), (3), (4), (5bis), (5ter), (9) et (10), la séquence de ce peptide homologue résultant des alignements verticaux de ses propres acides aminés successifs eux-

mêmes contenus dans la séquence peptidique pertinente relative au virus VIH-1-M correspondant et représenté dans la figure 8 ou 9 avec les acides aminés successifs de la séquence du peptide choisi, telle qu'elle découle aussi de la figure 8 ou 9.

5

Selon la présente invention, le procédé de détection et de discrimination entre infection par un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M est caractérisé par la mise en contact de sérum issu des personnes soumises à un test de diagnostic de SIDA, notamment avec le peptide RILAVERY.

10

En outre, le procédé de détection d'infection due soit à un rétrovirus VIH-1 sous-groupe O, soit VIH-1 sous-groupe M, est caractérisé par l'utilisation de mélanges de deux catégories de peptides, ceux de la première catégorie correspondant aux peptides (1), (2), (3), (4), (5bis), (5ter) (9) et (10).

15

Par ailleurs, le procédé de discrimination entre une infection due à un rétrovirus VIH-1-O DUR, et une infection due à un autre type de rétrovirus VIH-1-O, est caractérisé par la mise en contact de l'échantillon biologique étudié avec l'un quelconque des peptides (11) à (15) ou des peptides (17) à (20).

20

Alternativement il s'agit d'un procédé de discrimination entre une infection par un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M mettant en oeuvre une sérine protéase dont l'action de clivage s'effectue au niveau d'un dipeptide SR et comprenant la détection d'un clivage ou d'un non-clivage de la boucle V3 de la gp 120 du rétrovirus selon que ce rétrovirus est un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O ou un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M.

25

L'invention concerne en outre une composition pour la détection et la discrimination dans un échantillon biologique entre un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M et un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, comprenant un mélange de deux catégories de peptides, la

30

première étant notamment ceux identifiés (1), (2), (3), (4), (5bis), (5ter), (9) et (10).

5 Entrant également dans le cadre de la présente invention les anticorps monoclonaux spécifiques des séquences de chacun des peptides (1) à (20).

L'invention concerne également un plasmide choisi parmi ceux qui ont été déposés à la CNCM le 24 Février 1995 sous les références I-1548, I-1549 et I-1550.

10 L'invention vise également des acides nucléiques contenant une séquence codant chacun des peptides (1) à (20) définis dans la présente invention.

Parmi les séquences d'acides nucléiques préférées on choisira notamment les séquences nucléotidiques représentées aux figures 10, 11 ou 12.

15 L'invention a également trait aux vecteurs contenant un acide nucléique tel qu'il est défini ci-dessus.

L'invention vise également des cellules susceptibles de contenir l'un quelconque desdits acides nucléiques ou desdits vecteurs.

20 La présente invention concerne également un virus tel que celui déposé le 23 Février 1995 à la CNCM sous la référence I-1542.

Un virus entrant également dans le cadre de l'invention est un virus de même groupe que le précédent, caractérisé en ce que des peptides consensus de ce virus sont reconnus par des anticorps reconnaissant spécifiquement un polypeptide ou un peptide précédemment défini.

25 L'ARN génomique de ce virus entre également dans le cadre de l'invention.

30 Entre également dans le cadre de l'invention, un nécessaire ou trousse de détection d'anticorps dans le sérum ou tout autre

échantillon biologique de patient susceptible d'être infecté par un rétrovirus humain du type HIV, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un polypeptide ou un peptide ayant notamment pour séquence une des séquences (1) à (20) précédemment décrites.

5 - des moyens permettant la réaction de formation du complexe immunologique entre le(s) polypeptide(s) ou le(s) peptide(s) et les anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique à tester, par exemple si besoin un ou plusieurs tampons d'incubation,

- un échantillon témoin négatif,

10 - des moyens de révélation du complexe antigène/anticorps formé.

Egalement selon l'invention, cette trousse contient, en outre, au moins un polypeptide ou un peptide consensus dérivé d'une autre souche HIV ou d'un polypeptide ou d'un peptide comprenant,

15 soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de ce polypeptide ou peptide dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus,

20 soit une séquence d'acides aminés dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le polypeptide ou le peptide consensus.

25 Préférentiellement, une trousse selon l'invention contiendra, en outre, au moins un polypeptide ou un peptide dérivé d'une autre souche HIV, de préférence la souche HIV-LAI.

30 L'invention concerne également une composition polypeptidique pour le diagnostic in vitro d'une infection due à un rétrovirus selon l'invention, ou à un de ses variants ce diagnostic s'effectuant dans un échantillon biologique susceptible de contenir les

anticorps formés après ladite infection. Cette composition est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins l'un des peptides (1) à (20).

L'échantillon biologique peut être constitué notamment de sang, de plasma, de sérum ou de tout autre extrait biologique. Les compositions ci-dessus sont utilisables pour la détection d'anticorps dans un des échantillons biologiques susdits.

L'invention vise donc également une méthode de diagnostic in vitro d'une infection due spécifiquement à un rétrovirus du type HIV, caractérisée par les étapes de :

- mise en contact d'un échantillon biologique susceptible de contenir des anticorps produits à la suite d'une infection par un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, avec un peptide tel que précédemment défini, ou avec une composition peptidique telle que précédemment définie, dans des conditions appropriées permettant la formation d'un complexe immunologique du type antigène/anticorps,

- détection de l'éventuelle présence du complexe.

L'invention concerne par ailleurs une composition immunogène, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un peptide en association avec un véhicule pharmaceutique acceptable pour la constitution de vaccins.

L'invention se rapporte également à un procédé de préparation des protéines de capsid et des glycoprotéines gp41 et gp120 d'une souche rétrovirale selon l'invention, le procédé étant caractérisé par les étapes suivantes :

- lyse des cellules infectées par un rétrovirus VIH-1 selon l'invention et séparation du sumageant et des cellules infectées ou lyse des culots viraux préparés par centrifugation,

- dépôt de l'extrait cellulaire et/ou de l'extrait viral sur immuno-adsorbant contenant des anticorps purifiés, obtenus à partir d'un sérum de sujet infecté par un rétrovirus selon l'invention, et fixés avantageusement sur un support adapté, ledit sérum de sujet infecté

ayant la capacité de réagir fortement avec des protéines d'enveloppe du virus selon l'invention,

- incubation en présence d'un tampon et pendant un temps suffisamment long pour obtenir la formation d'un complexe immunologique antigène/anticorps,

- lavage de l'immuno-adsorbant avec un tampon pour éliminer les molécules non retenues sur le support,

- récupération des protéines antigéniques recherchées.

Selon un premier mode de réalisation de ce procédé de préparation, la séparation et la récupération des protéines de capsid et des glycoprotéines gp41 et gp120 de VIH-1 DUR sont faites par électrophorèse et par électroréduction des protéines.

Selon un autre mode de réalisation de ce procédé de préparation, la récupération des protéines est obtenue par :

- élution des protéines fixées sur l'immuno-adsorbant ci-dessus,

- purification des produits ainsi élués sur une colonne de chromatographie contenant, fixés sur le support de séparation, des anticorps reconnaissant les protéines de capsid et les glycoprotéines gp41 et gp120 de VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR.

Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé de production d'un polypeptide ou d'un peptide selon l'invention, ce polypeptide ou peptide étant obtenu

- soit par l'expression d'un acide nucléique de l'invention,

- soit par synthèse chimique, par addition d'acides aminés jusqu'à l'obtention de ce polypeptide ou de ce peptide.

Les principes et les procédés classiques du génie génétique peuvent être ici utilisés (« Molecular cloning », Sambrook, Fritsch, Maniatis, CSH 1989)

Entre également dans le cadre de l'invention, un procédé de production d'un acide nucléique précédemment défini, pouvant être

produit soit par isolement à partir d'un virus de l'invention, soit par synthèse chimique, soit en utilisant des techniques d'amplification in vitro des acides nucléiques à partir d'amorces spécifiques.

Des amorces oligonucléotidiques également selon l'invention ont une séquence consistant en au moins huit nucléotides consécutifs des séquences nucléotidiques suivantes:

ATT CCA ATA CAC TAT TGT GCT CCA -3'

AAA GAA TTC TCC ATG ACT GTT AAA -3'

GGT ATA GTG CAA CAG CAG GAC AAC-3'

AGA GGC CCA TTC ATC TAA CTC-3'

Ces amorces peuvent être utilisées lors d'un processus d'amplification génique, par exemple par PCR ou une technique équivalente, d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide de l'invention. Des tests effectués avec ces amorces ont fourni des résultats concluants.

Egalement, l'invention concerne une trousse permettant l'amplification par PCR ou une technique équivalente ci-dessus décrite.

Entre également dans le cadre de la présente invention, un procédé de détection de la présence dans un échantillon biologique d'acide(s) nucléique(s) caractéristique(s) d'une rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR, y inclus d'un rétrovirus selon l'invention. Ce procédé comprend une mise en contact d'un ADNc formé à partir d'ARN(s) contenu(s) dans cet échantillon biologique, dans des conditions permettant l'hybridation de cet ADNc avec le génome rétroviral, et la réalisation d'une amplification génique sur cet échantillon viral.

L'invention concerne également un lysat viral tel qu'il est obtenu par lyse des cellules infectées par un virus selon l'invention

Un extrait protéique d'une souche VIH-1 (DUR) (ou VIH-1 (VAU)) contenant notamment un polypeptide ou un peptide tel que précédemment défini entre également dans le cadre de l'invention.

L'invention concerne des peptides particuliers issus de structure de VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR ou de variants de ce rétrovirus et qui permettent

soit de discriminer, selon le cas ,

- de façon globale entre des VIH-1 appartenant à la catégorie O et des VIH-1 appartenant à la catégorie M,

- ou plus spécifiquement entre des virus appartenant au sous-groupe caractéristique du VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR et d'autres virus du sous-groupe O,

soit de au contraire de reconnaître la plupart, sinon tous les rétrovirus à la fois du groupe (ou sous-groupe) O et du sous-groupe M.

Entrent également dans le cadre de l'invention les peptides correspondants et issus de protéines de structure correspondantes d'autres virus du VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O ou VIH-1 sous-groupe M, en particulier ceux dérivés des protéines de structure GAG, gp120 et gp41 dont des parties sont indiquées dans les dessins, ces peptides homologues découlant de leur mise en alignement, comme il résulte aussi des dessins avec les peptides issus du VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR , plus particulièrement identifiés dans le présent texte.

Par voie de symétrie, certains peptides homologues peuvent être mis en oeuvre dans ceux des essais qui permettent de procéder aux susdites discriminations, étant alors entendu qu'ils sont alors utilisés en lieu et place des peptides correspondants, issus des protéines de structure GAG, gp120 et gp41.

Détermination d'oligonucléotides spécifiques du groupe O.

A l'aide de la séquence VAU et de sa corrélation aux séquences MVP5180 et ANT70, on a défini des amorces oligonucléotidiques s'efforçant d'être spécifiques du sous-groupe O dans son entièreté pour la région V3 et la région gp41. Celles-ci ont permis d'amplifier la souche DUR et ont en conséquence constitué un solution

au problème d'amplification rencontré. La position ainsi que la séquence de ces amorces HIV sous-groupe O sont représentées à la figure 13. Ces amorces permettent l'obtention d'une bande d'amplification visible en coloration au bromure d'éthidium avec une seule étape de 30 cycles de PCR. Des séquences partielles ont été obtenues:

- GAG : 513 paires de bases (171 acides aminés) = Seq ID N° 9

- gp 120 boucle V3 : 525 paires de bases (75 acides aminés) = Seq ID N°10

- gp41 région immunodominante : 312 paires de bases (104 acides aminés) = Seq ID N° 11.

Les comparaisons nucléotidiques (figure 15) et protéiques (figure 16) des séquences DUR aux séquences MVP5180, ANT et VAU pour le sous-groupe O, LAI pour le consensus VIH-1, MAL séquence africaine VIH-1 représentative, et CPZ pour le CIV du chimpanzé gabonais, montrent que DUR est aussi éloigné des autres VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O publiés que ceux-ci le sont entre eux.

Les différences sont moindres dans la région GAG et maximales dans la région de la boucle V3 de gp120, où la comparaison protéique atteint 40% de différence (figure 16). Les arbres phylogéniques confirment d'une part que la souche DUR fait partie du sous-groupe O, et d'autre part l'importance des différences entre les diverses souches O décrites, sans pour autant que des embranchements de sous-types ne se dégagent nettement (figure 17).

Comparaison des séquences GAG :

Lors de la comparaison de la séquence GAG obtenue aux deux autres souches O publiées ANT70 et MVP5180 ainsi qu'aux séquences représentatives du groupe M (figure 8), on a pu constater qu'il existe un consensus O sur plusieurs zones, distinct du consensus M dans les mêmes zones. On peut aussi relever deux zones hyper-variables, plus

variables pour O que pour M, et quelques différences ponctuelles pour l'une ou l'autre souche. Néanmoins, les régions SPRT....SEGA, MLNAI....KEVIN, GPLPP....QQEQI, VGD....SPV paraissent discriminatives du consensus O versus le consensus M.

Les régions QQA et LWTRAGNP sont des régions hyper-variables. La souche VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR se singularise en trois positions vis-à-vis du consensus M et O (L pour I et 2 fois pour E) et prend un acide aminé spécifique en trois positions hyper-variables isolées V position L9 ; A position A77 ; L position 110.

En outre, il est possible de définir dans la région GAG des segments communs au groupe O et au groupe M tels que SPRTLNAWVK, GSDIAGTTST et QGPKEPFRDYVDRF.

Comparaison des séquences de la boucle V3

Cette étude comparative a révélé des différences considérables atteignant 56% de différences protéiques avec le consensus VIH-1 sous-groupe M, et 35 à 42% avec les autres VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O.

Les alignements de séquences peptidiques des régions de la boucle V3 de gp120 et de la région immunodominante de gp41 est donné à la figure 9. La séquence de l'intérieur de la boucle V3 de la souche DUR diffère substantiellement de celle du consensus VIH-1 sous-groupe M. Elle partage le motif GPMWYISM avec les souches VAU et ANT70 mais pas avec la souche MVP qui présente deux substitutions : R pour A et R pour Y.

Les parties gauche et droite du reste de la boucle V3 sont nettement différentes de tous les autres HIV connus et ne laissent pas supposer d'autres réactivités croisées. De plus, la boucle V3 de DUR est plus longue d'un acide aminé que les autres séquences O, elles-mêmes plus longues d'un autre acide aminé que les séquences de groupe VIH-1 M.

Comparaison des alignements concernant la région immunodominante de la gp41

5 La « mini boucle » de la souche DUR, de séquence CRGKAIC, s'est avérée être très spécifique de cette souche : elle constituerait une épitope (voir figure 9). En outre, cette séquence serait susceptible d'intervenir dans la modification des conditions de dépliage de la glycoprotéine gp41, et en conséquence dans l'infectuosité de la souche.

10 Une longue séquence de 11 acides aminés flanquant à gauche cette boucle est identique à la séquence VAU. On peut noter un polymorphisme de la souche DUR pour une position S ou T selon les clones analysés.

15 Sont également représentés dans la figure 9 des peptides correspondants issus d'autres souches rétrovirales connues.

La souche DUR permet également de définir un consensus HIV sous-groupe O de la région gp41 dont plusieurs régions homologues suffisamment longues pourraient être utilisées. Ces régions homologues sont entre autres: RL* ALET, QNQQ, LWGC, CYTV (* représentant un
20 acide aminé variable) .

Corrélations sérologiques :

25 L'antisérum anti-DUR ne réagit pas avec les peptides de la boucle V3 du consensus VIH-1-M, du VIH-1 MAL, du VIH-1 CPZ ou du VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O MVP5180, mais réagit cependant avec le peptide de la boucle V3 de l'VIH-1-O ANT70. Concernant la région immunodominante gp41, il ne réagit pas avec le consensus VIH-1 sous-groupe M « classique », mais réagit cependant, faiblement mais de façon surprenante, avec le consensus VIH-1 sous-groupe M étendu à droite.

REFERENCES

- Agut, H., Candotti, D., Rabanel, B., Huraux, J., Remy, G., Ingrand, D., Tabary, T., Chippaux, C., Chamaret, S., Guétard, D., Dauguet, C. et Montagnier, L. (1992).
- 5 Isolation of atypical VIH-1-related retrovirus from AIDS patient (L'isolement de rétrovirus atypique apparenté au VIH-1 de patient atteint du SIDA). *Lancet*. 340, 681-682.
- 10 Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. et Sonigo, P. (1986). Genetic variability of the AIDS virus : nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients (Variabilité génétique du virus du SIDA : analyse de la séquence nucléotidique de deux isolats de patients africains). *Cell*. 46, 63-74.
- 15 Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. et Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (Isolement d'un rétrovirus lymphotrope T d'un patient présentant un risque de symptôme de l'immunodéficience acquise (SIDA)). *Science*. 20, 868-871.
- 20 Benn, S., Rutledge, R., Folks, T. et al, e. (1985). Genomic heterogeneity from AIDS retroviral isolates from North America and Zaire (Hétérogénéité génomique d'isolats rétroviraux de SIDA de l'Amérique du Nord et du Zaire). *Science*. 230, 949-951.
- 25 Clavel, F. et Charneau, P. (1994). Fusion from without directed by Human immunodeficiency virus particles (Fusion de l'extérieur dirigée par des particules du virus de l'immunodéficience humaine). *J. Virol*. 68, 1179-1185.
- 30

- 5 Clavel, F., Guétard, D., Brun-Vézinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J. L. et Montagnier, L. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS (Isolement d'un nouveau rétrovirus humain de patients ouest-africains atteints du SIDA). *Science*. 233, 343-346.
- 10 De Cock, K. M., Adjuorlolo, G., Epkini, E., Sibailly, T., Kouadio, J., Maran, M., Brattegaard, K., Vetter, K., Doorly, R. et Gayle, H. (1993). Epidemiology and transmission of VIH-2 : why there is no VIH-2 epidemic (Epidémiologie et transmission de VIH-2 : pourquoi il n'y a aucune épidémie de VIH-2). *JAMA*. 270, 2083-2086.
- 15 De Leys, R., Vanderborght, B., Vanden Haesevelde, M., Heyndrickx, L., van Geel, A., Wauters, C., Bemaerts, R., Saman, E., Nijs, P. et Willems, B. (1990). Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin (Isolement et caractérisation partielle d'un rétrovirus inhabituel de l'immunodéficience humaine de deux personnes originaires de l'Afrique de l'Ouest Centrale). *J Virol*. 64, 1207-1216.
- 20 Gnann, J., Cormick, J., Michell, S., Nelson, J. et Oldstone, M. (1987). Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and type 2 infections (L'immunodosage par peptide de synthèse distingue les infections de HIV du type 1 et du type 2. *Science*. 237, 1346-1349.
- 25 Grez, M., Dietrich, U., Balfe, P., von Briesen, H., Maniar, J., Mahambre, G., Delwart, E., Mullins, J. et Rubsamen-Waigmann, H. (1994). Genetic analysis of Human Immunodeficiency virus type 1 and 2 (VIH-1 and VIH-2) mixed infections in India reveals a recent spread of VIH-1 and VIH-2
- 30

from a single ancestor for each of these virus s (L'analyse génétique d'infections mixtes du virus de l'immunodéficience humaine du type 1 et 2 (VIH-1 et VIH-2) en Inde révèle une propagation récente de VIH-1 et de VIH-2 à partir d'un seul ancêtre pour chacun de ces virus). *J. Virol.* 68, 2161-2168.

Gürtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J. M. et Kaptue, L. (1994). A new subtype of Human Immunodeficiency Virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon (Un nouveau sous-type de virus de l'immunodéficience humaine du type 1 (MVP-5180) du Cameroun). *J Virol.* 68, 1581-1585.

Harada, S., Koyanagi, Y. et Yamamoto, N. (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay (Infection de HTLV-III/LAV dans des cellules MT-2 et MT-4 porteuses de HTLV-I et application dans un dosage sur plaque). *Science.* 229, 563-566.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures (Extraction sélective d'ADN de polyome à partir de cultures de cellules de souris infectées). *J. Mol. Biol.* 26, 365-369.

Huet, T., Cheynier, R., Meyerhans, A., Roelants, G. et Wain-Hobson, S. (1990). Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to VIH-1 (Organisation génétique d'un lentivirus de chimpanzé apparenté au VIH-1). 345, 356-359.

Javaherian, K., Langlois, A. J., LaRosa, G. J., Profy, A. T., Bolognesi, D. P., Herlihy, W. C., Putney, S. D. et Matthews, T. J. (1990). Broadly neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of VIH-1 (Anticorps neutralisant un spectre large induit par le

déterminant neutralisant hypervariable de VIH-1). *Science*. 250, 1590-1593.

5 Javaherian, K., Langlois, A. J., Mc Danal, C., Ross, K. L., Eckler, L. I.,
Jellis, C. L., Profy, A. T., Rusche, J. R., Bolognesi, D. P., Putney, S. D. et
Matthews, T. J. (1989). Principal neutralizing domain of the human
immunodeficiency virus type 1 envelope protein (Domaine neutralisant
principal de la protéine d'enveloppe du virus de l'immunodéficience
humaine de type 1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 6768-6772.

10 Louwagie, J., McCutchan, F., Peeters, M., Brennan, T., Sanders-Buell, E.,
Eddy, G., van der Groen, G., Fransen, K., Gershy-Damet, G. et Deleys, R.
(1993). Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international VIH-1
isolates provides evidence for multiple genotypes (L'analyse
15 phylogénétique de gènes gag de 70 isolats internationaux de VIH-1
fournit la preuve de génotypes multiples). *AIDS*. 7, 769-80.

Louwagie, J., McCutchan, F., Van der Groen, G., Peeters, M., Fransen,
K., Piot, P., Gershy-Damet, G., Roelants, G., Van Heuverswyn, II. et Eddy,
20 G. (1992). Genetic comparison of VIH-1 isolates from Africa, Europe, and
North America (Comparaison génétique d'isolats de VIH-1 de l'Afrique, de
l'Europe et de l'Amerique du Nord). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 8, 1467-
9.

25 Matsushita, S. M., Robert-Guroff, M., Rusche, J., Koito, A., Hattori, T.,
Hoshino, H., Javaherian, K., Takatsuki, K. et Putney, S. (1988).
Characterization of a Human immunodeficiency virus neutralizing
monoclonal antibody and mapping of the neutralizing epitope. (Carac-
térisation d'un anticorps monoclonal neutralisant le virus de
30 l'immunodéficience humaine et cartographie de l'épitope neutralisant). *J.
Virol* 62, 2107-2114.

NKENGASONG, J.N. et al., *AIDS* 1993, Vol. 7, N° 11, pp. 1536-1538.

5 Rey, M. A., Krust, B., Laurent, A. G., Montagnier, L. et Hovanessian, A. G.
(1989). Characterization of human immunodeficiency virus type 2
envelope glycoproteins : dimerization of the glycoprotein precursor during
processing (Caractérisation des glycoprotéines d'enveloppe du virus de
l'immunodéficience du type 2 : dimérisation du précurseur glycoprotéique
au cours de la maturation). *J. Virol.* 63, 647-658.

10

ULMER J.B. et al., *Science* Vol. 259, Mars 1993, pp. 1745-1749.

15 Vanden Heasevelde, M., Decourt, J. L., de Leys, R. J., Vanderborgh, B.,
van der Groen, G., van Heuverswijn, H. et Saman, E. (1994). Genomic
cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African
Human Immunodeficiency Virus isolate (Clonage génomique et analyse
de la séquence complète d'un isolat africain très divergeant du virus de
l'immunodéficience humaine). *J Virol.* 68, 1586-1596.

20 Vartanian, J.-P., Meyerhans, A., Asjö, B. et Wain-Hobson, S. (1991).
Selection, recombination, and G→A hypermutation of VIH-1 genomes
(Sélection, recombinaison, et hypermutation G→A de génomes de VIH-1).
J. Virol. 65, 1779-1788.

25 Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S. et Alizon, M. (1985).
Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV (Séquence nucléotidique du
virus du SIDA, LAV). *Cell* 40, 9-17.

REVENDEICATIONS

1. Protéine de rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ou polypeptide ou peptide naturel ou synthétique comprenant au moins
5 une partie de ladite protéine, susceptible d'être reconnue par des anticorps isolables à partir de sérum obtenu suite à une infection par une souche VIH-1 groupe O VAU, ou une souche VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR.
2. Protéine, polypeptide ou peptide selon la revendication
10 1 caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par l'expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique plus particulièrement ADN et fragments d'ADN clonés pouvant être obtenus à partir de l'ARN, de ADNc ou d'amorces utilisables pour l'amplification génique, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ladite séquence
15 nucléotidique étant caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence correspondant à Seq ID N° 5 ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible de s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, et en ce que
20 ladite protéine comprend la séquence d'acides aminés comprise entre les résidus 1 et 526 de Seq ID N° 6 ainsi que tout peptide, polypeptide, glycoprotéine ou variant dérivé de ladite séquence ayant un épitope susceptible d'être reconnu par des anticorps induits par le virus VIH-1 (VAU).
3. Protéine, polypeptide ou peptide selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle peut être obtenue par
25 l'expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique selon la revendication 1, et en ce que ladite protéine comprend la séquence d'acides aminés comprise entre les résidus 527 à 877 de Seq ID N° 7 ainsi que tout peptide, polypeptide, glycoprotéine ou variant dérivé de ladite séquence ayant un épitope susceptible d'être reconnu par des anticorps
30 induits par le virus VIH-1 (VAU).

4. Polypeptide ou peptide selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence CKNRLIC ou en particulier la séquence RLLALETFIQNWWLLNLWGCKNRLIC ou un variant de cette séquence tel que la séquence RLWALETLIQNQQRLNLWGCKGKLIC, la séquence RLLALETLLQNQQLLSLWGCKGKLVC, la séquence RARLLALETFIQNQQLLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT, la séquence CERPGNQKIMAGPMAWYS MALSNTKGDTRAAYC ou la séquence GPMAWY..
5. Peptide synthétique caractérisé en ce qu'il s'agit d'un fragment d'une protéine selon l'une des revendications 1 à 4, en ce qu'il est issu de la séquence SEQ ID N° 6 ou de la séquence SEQ ID N° 7 et en ce qu'il est reconnu par des anticorps induits contre un rétrovirus VIH-1_(VAU) ou variant de ce fragment capable d'être reconnu par des anticorps induits par un rétrovirus VIH-1_(VAU).
6. Protéine, polypeptide ou peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite protéine est une protéine du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O_(DUR), déposé le 23 février 1995 à la CNCM sous la référence I-1542 ou un polypeptide ou peptide naturel ou synthétique comprenant au moins une partie de ladite protéine ou un peptide dont la séquence se distingue de celle du précédent par substitution, délétion ou addition d'acides aminés, ce peptide distinct conservant néanmoins les caractéristiques antigéniques du précédent.
7. Peptide selon la revendication 6 comportant au moins 4 acides aminés consécutifs dont la séquence entière en acides aminés consécutifs est contenue dans la séquence GAG représentée à la figure 8 ou dans une séquence GAG immunologiquement semblable issue d'un variant du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O_{DUR}, ladite séquence immunologiquement semblable étant reconnue par des anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des séquences AHPQQA, LWTTRAGNP contenues dans la séquence GAG de la figure 8.

8. Peptide selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il consiste en un peptide dont la séquence en acides aminés est contenue, soit dans l'une des séquences suivantes :

SPRTLNAWVKAVEEKAFNPEIIPMFMALEGA (1)

MLNAIGGHQGGALQVLKEVIN (2)

GPLPPGQIREPTGSDIAGTTSTQQEQI (3)

IPVGDIYRKWIVLGLNKMVKMYSVPSILDI (4)

QGPKEPFRDYVDRLFYKTKLAE (5)

AHPQQA (5 bis)

LWTTTRAGNP (5ter),

soit dans la séquence immunologiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs de l'une desdites séquences.

9. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste en un peptide dont la séquence en acides aminés est contenue soit dans l'une des séquences suivantes :

SPRTLNAWVK (6)

GSDIAGTTST (7)

QGPKEPFRDYVDRLF (8)

soit dans la séquence immunologiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins quatre acides aminés consécutifs de l'une desdites séquences.

10. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il contient la séquence en acides aminés suivante :

NPEI (9)

11. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il contient la séquence en acides aminés suivante :

AVEEKAFNPEIIPMF (10)

12. Peptide selon la revendication 6, comportant au moins 4 acides aminés consécutifs, dont la séquence entière est contenue dans la séquence de la région de la boucle V3 de la gp120 représentée à la

figure 9 ou dans la séquence correspondante immunologiquement semblable, issue d'un variant du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR, ladite séquence immunologiquement semblable étant reconnue par des anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des
5 séquences :

KEIKI (12),

EREGKGAN (13).

CVRPGNNSVKEIKI (14),

QIEREGKGANSR (15).

10

13. Peptide selon la revendication 12 contenant :

a) soit la séquence

CVRPGNNSVKEIKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAFC (11) ou une
partie de cette séquence qui contienne au moins 4 acides aminés

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la
15 séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par deux acides aminés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le susdit peptide,

c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b)
dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés
20 sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

d) soit la séquence ou partie de séquence
immunologiquement semblable correspondante.

14. Peptide selon la revendication 13 qui contient la
25 séquence KEIKI (12).

15. Peptide selon la revendication 13 qui contient la
séquence EREGKGAN (13).

16. Peptide selon la revendication 13 ou 14 qui contient
soit la séquence d'acides aminés CVRPGNNSVKEIKI (14), soit la
30 séquence QIEREGKGANSR (15).

17. Peptide selon la revendication 13, qui comprend la séquence GPMAWYSM (16).

18. Peptide selon la revendication 6, comportant au moins 4 acides aminés consécutifs, dont la séquence entière est contenue dans la séquence de la région immunodominante de la gp41 représentée à la figure 9 ou dans la séquence correspondante immunologiquement semblable, issue d'un variant du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR, ladite séquence immunologiquement semblable étant reconnue par des anticorps reconnaissant aussi de façon spécifique au moins l'une des séquences :

RLLAETLMQNQQL (17),

LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18),

CRGKAI (19),

SVQWN (20),

RLLAETLMONQQLLN LWGCRGKAICYTS (21),

QNQQLLN LWGCRGKAICYTSVQWN (22).

19. Peptide selon la revendication 18, contenant la séquence RLLAETLMQNQQL (17) LNLWGCRGKAICYTSVQWNETWG (18) ou partie de ce peptide contenant :

a) soit la séquence CRGKAI (19), soit la séquence SVQWN (20) dans laquelle Q est le cas échéant remplacé par un acide aminé différent, néanmoins différent aussi de K, soit les deux séquences à la fois,

b) soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de a) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par deux acides aminés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

c) soit une séquence d'acides aminés distincte selon a) ou b) dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide de a),

d) soit dans la séquence ou partie de séquence immunologiquement semblable correspondante.

20. Peptide selon la revendication 19, caractérisé en ce que sa séquence N terminale qui contient au moins 8 acides aminés, n'est pas immunologiquement reconnue par des anticorps formés contre la séquence RILAVERY contenue dans la région immunodominante de la gp41 de la souche VIH-1-LAI.

21. Peptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il n'est pas reconnu par des anticorps formés contre le peptide SGKLIC de la souche VIH-1-LAI.

22. Peptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il contient l'une ou l'autre des deux séquences suivantes :

RLLALETLMONQQLLNWGCGRGKAICYTS (21)

QNQQLLNWGCGRGKAICYTSVQWN (22)

23. Séquence nucléotidique, plus particulièrement ADN et fragments d'ADN clonés pouvant être obtenus à partir de l'ARN, de ADNc ou d'amorces utilisables pour l'amplification génique, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ladite séquence nucléotidique étant caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence correspondant à l'une des séquences Seq ID N° 5, Seq ID N° 9, Seq ID N° 10 ou Seq ID N° 11 ainsi que toute portion de cette séquence, notamment les séquences codant les protéines polypeptides ou peptides de l'une quelconque des revendications 8 à 22 ou variant de cette portion susceptible de s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O.

24. Séquence nucléotidique selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'il s'agit d'ADN ou de fragments d'ADN obtenus à partir de l'ARN, de ADNc ou d'amorces pour l'amplification génique, dérivés de l'ARN ou de l'ADN du rétrovirus VIH-1_(NAU), ou VIH-1_(OUB), la séquence comprenant l'enchaînement correspondant à Seq ID N° 5 ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible

d s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus VIH-1_(VAU), ou la séquence comprenant l'enchaînement correspondant à Seq ID N° 9 ou Seq ID N° 10 ou Seq ID N° 11, ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible d'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus VIH-1_(OUI).

25. Séquence nucléotidique selon la revendication 23 ou la revendication 7, caractérisée en ce que ladite séquence est choisie parmi le groupe de séquences correspondant à Seq ID N° 1, Seq ID N° 2, Seq ID N° 3 et Seq ID N° 4.

26. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement de nucléotides correspondant à SEQ ID N° 7 et en ce qu'elle code l'intégrase d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, en particulier d'un rétrovirus VIH-1_(VAU) ou séquence nucléotidique s'hybridant avec la séquence contenant l'enchaînement SEQ ID N° 7.

27. Oligonucléotide comprenant au moins 9 nucléotides, tel qu'obtenu à partir d'une séquence nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, susceptible d'être utilisée comme amorce pour l'amplification génique d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O.

28. Oligonucléotide selon la revendication 27 ayant une séquence consistant en au moins neuf nucléotides consécutifs des séquences nucléotidiques suivantes:

ATT CCA ATA CAC TAT TGT GCT CCA -3'

AAA GAA TTC TCC ATG ACT GTT AAA -3'

GGT ATA GTG CAA CAG CAG GAC AAC -3'

AGA GGC CCA TTC ATC TAA CTC -3'

29. Oligonucléotide selon la revendication 28 caractérisé en ce qu'il peut être utilisé lors d'un processus d'amplification génique d'une séquence nucléotidique codant un peptide selon l'une quelconque des revendications 6 à 22.

30. Séquence de nucléotides utilisable comme sonde, caractérisée en ce qu'elle hybrid dans des conditions d'hybridation de forte stringence avec l'ADN produit par amplification génique au moyen d'amorces selon l'une quelconque des revendications 27 à 29.

5 31. Composition pour la détection de la présence ou non d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, notamment le rétrovirus VIH-1_(VAU) et/ou VIH-1_(DUR) dans des échantillons de sérum ou d'autres liquides ou tissu biologique obtenu à partir de patients suspectés d'être
10 porteurs d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue du génome du virus VIH-1_(VAU), particulièrement un fragment de l'ADN de VIH-1_(VAU) contenant la région ou une partie de la région *env* du virus VIH-1_(VAU), d'un variant de VIH-1_(VAU) tel que défini à l'une quelconque des revendications
15 23 à 27, et/ou une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue du génome du virus VIH-1_(DUR), l'ADN de VIH-1_(DUR) contenant la région ou une partie de la région *env* et une partie de la région GAG du virus VIH-1_(DUR) tel que défini la revendication 23 ou 24.

20 32. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce que ladite composition comprend également une sonde obtenue à partir d'une séquence nucléotidique issue de VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou de VIH-2.

25 33. Composition pour la détection de la présence ou non d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, notamment le rétrovirus VIH-1_(VAU) et/ou le rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O_(DUR) dans un échantillon biologique, ladite composition étant caractérisée en ce qu'elle comprend au moins deux séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, et au moins deux séquences nucléotidiques selon la revendication 23 ou 24 respectivement issues du
30 génome des virus VIH-1_(VAU) et VIH-1_(DUR), utilisables en tant qu'amorces

d'amplification notamment par PCR de l'ADN et/ou de l'ARN d'un rétrovirus VIH-1 du sous-groupe O et en particulier de VIH-1_(NAU) et VIH-1_(DUR).

34. Séquence nucléotidique caractérisée en ce qu'il s'agit d'une séquence d'ARN correspondant à une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 23 à 31.

35. Composition pour la détection in vitro de la présence dans un échantillon biologique humain d'anticorps anti-VIH-1_(NAU) et anti-VIH-1_(DUR), ladite composition comprenant au moins un antigène comprenant une protéine, une glycoprotéine, un polypeptide ou un peptide de la protéine d'enveloppe d'un rétrovirus VIH-1_(NAU) tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 et/ou de la séquence comprenant l'enchaînement correspondant à Seq ID N° 9 ou Seq ID N°10 ou Seq ID N° 11, ainsi que toute portion de cette séquence ou variant de cette portion susceptible de s'hybrider avec l'ADN ou l'ARN correspondant du virus VIH-1_(DUR).

36. Composition selon la revendication 35, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un antigène tel qu'une protéine, une glycoprotéine, un polypeptide ou un peptide d'un virus VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou d'un virus VIH-2 ou un peptide dérivé d'un virus VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou d'un virus VIH-2 ayant un épitope susceptible d'être reconnu par les anticorps induits par le virus VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou le virus VIH-2.

37. Composition selon la revendication 36, caractérisée en ce que les protéines et/ou glycoprotéines de VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou de VIH-2 sont des protéines gag, pol ou des peptides de celles-ci.

38. Composition selon la revendication 37, caractérisée en ce que les protéines et/ou glycoprotéines de VIH-1 n'appartenant pas au sous-groupe O et/ou de VIH-2 sont des glycoprotéines d'enveloppe.

39. Composition selon l'une quelconque des revendications 35 à 38, caractérisée en ce que ladite composition comprend une séquence peptidique correspondant à l'ensemble de la région 590-620 de la protéine gp41 de VIH-1_(VAU) ou une partie de cette région spécifique à VIH-1_(VAU).

40. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ladite séquence peptidique est la séquence -TFIQN-, CKNRLIC ou WGCKNR.

41. Anticorps susceptible de reconnaître une protéine, un peptide ou un polypeptide dérivé de ladite protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

42. Procédé de diagnostic in vitro d'une infection causée par le virus VIH-1_(VAU) et/ou par le virus VIH-1_(DUR), ledit procédé comprenant :

- la mise en contact d'un sérum ou d'un autre milieu biologique provenant d'un malade faisant l'objet du diagnostic avec au moins une des protéines, glycoprotéines d'enveloppe du virus VIH-1_(VAU) et/ou VIH-1_(DUR) ou d'un polypeptide ou d'un peptide issu d'une de ces protéines ou glycoprotéines respectivement selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et selon l'une quelconque des revendications 6 à 22 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 35 à 38, et
- la détection d'une réaction immunologique.

43. Réactif nécessaire à la réaction de western blot (immunoempreinte) ou d'ELISA comportant une protéine ou glycoprotéine d'enveloppe du virus VIH-1_(VAU) et/ou VIH-1_(DUR) ou d'un polypeptide ou d'un peptide issu d'une de ces protéines ou glycoprotéines selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 et selon l'une quelconque des revendications 6 à 22 ou une composition selon l'une quelconque des revendications 35 à 38.

44. Utilisation d'une séquence nucléotidique selon la revendication 23 ou 24 pour induire in vivo la synthèse d'anticorps dirigés contre l'antigène codé par ladite séquence.

45. Composition immunogène selon l'une quelconque des revendications 35 à 38, capable d'induire des anticorps chez l'animal.

46. Trousse (kit) de diagnostic pour la détection in vitro sur un échantillon biologique, d'une infection par un rétrovirus VIH-1 du sous-groupe O, par exemple d'un rétrovirus VIH-1_(EAU), et/ou VIH-1_(OHR) caractérisée en ce qu'elle comprend :

- 10 - des amorces selon l'une quelconque des revendications 27 à 29 pour l'amplification génique d'un rétrovirus VIH-1 du sous-groupe O,
- des réactifs nécessaires à la réaction d'amplification génique.

47. Trousse de détection in vitro, sur un échantillon biologique, d'un rétrovirus VIH-1 du sous-groupe O, caractérisée en ce qu'elle comprend comme sonde éventuellement marquée, au moins une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 23 à 29 et 34 ou une composition selon l'une des revendications 31, 32 ou 33, et éventuellement une autre sonde nucléotidique selon l'une quelconque des revendications 23 à 29 ou composition selon l'une quelconque des revendications 31, 32 ou 33, éventuellement immobilisée sur un support solide.

48. Trousse selon la revendication 28, caractérisée en ce qu'elle comprend également les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une hybridation.

49. Procédé de détection et de discrimination dans un échantillon biologique entre des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M caractérisé par la mise en contact de cet échantillon biologique avec un peptide choisi parmi les peptides (1), (2),

(3), (4), (5bis), (5t r) de la revendication 8 le peptide (9) de la revendication 10 et le peptide (10) de la revendication 11.

50. Procédé de détection et de discrimination dans un échantillon biologique entre des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et des anticorps caractéristiques d'un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M caractérisé par la mise en contact de cet échantillon biologique avec un peptide issu de l'un des virus VIH-1 sous-groupe M pris en considération dans les figures 8 et 9 et homologue d'un peptide choisi parmi ceux de la revendication 49, la séquence de ce peptide homologue résultant des alignements verticaux de ses propres acides aminés successifs, eux-mêmes contenus dans la séquence peptidique pertinente relative au virus VIH-1 sous-groupe M correspondant et représentée dans la figure 8 ou 9 avec les acides aminés successifs de la séquence du peptide choisi, telle qu'elle découle aussi de la figure 8 ou 9.

51. Procédé de détection et de discrimination entre infection par un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et du type VIH-1 sous-groupe M caractérisé par la mise en contact de sérums issus des personnes soumises à un test de diagnostic de SIDA, avec le peptide RILAVERY.

52. Procédé de détection d'infection due soit à un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, soit VIH-1 sous-groupe M, caractérisé par l'utilisation de mélanges de deux catégories de peptides, ceux de la première catégorie correspondant à ceux identifiés dans la revendication 49.

53. Procédé de discrimination entre une infection due à un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR ou variant, et une infection due à un autre type de rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, caractérisé par la mise en contact de l'échantillon biologique étudié avec l'un quelconque des peptides suivants :

- peptide (11) de la revendication 38, peptide (12) de la revendication 39 ou peptide (13) de la revendication 40,

- peptide (14) ou peptide (15) de la revendication 41 ou

- peptides (17), (18), (19) et (20) de la revendication 44.

5 54. Vecteur contenant un acide nucléique dont la séquence nucléotidique correspond à l'une quelconque des séquences des revendications 23 à 30.

 55. Vecteur selon la revendication 57, caractérisé en ce que c'est un plasmide.

10 56. Plasmide choisi parmi ceux qui ont été déposés à la CNCM le 24 Février 1995 sous les références I-1548, I-1549 et I-1550.

 57. Cellule contenant un acide nucléique dont la séquence nucléotidique correspond à l'une quelconque des séquences des revendications 54 ou 55.

15 58. Virus déposé le 23 Février 1995 à la CNCM sous la référence I-1542.

 59. Virus de même type ou sous type que le virus de la revendication 58 caractérisé en ce que des peptides consensus de ce virus sont reconnus par des anticorps reconnaissant spécifiquement un peptide selon l'une quelconque des revendications 6 à 22.

20 60. Trousse de détection in vitro d'anticorps contre HIV, contenant au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 6 à 22.

 61. Trousse selon la revendication 60, contenant en outre au moins un peptide consensus dérivé d'une autre souche HIV comprenant:

 soit une séquence d'acides aminés distincte de la séquence de ce peptide dans laquelle un ou plusieurs acides aminés sont substitués par d'autres acides aminés sous réserve que le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide consensus,

soit une séquence d'acides aminés dans laquelle un ou plusieurs acides aminés ont été supprimés ou ajoutés sous réserve que le polypeptide ou le peptide conserve sa réactivité avec un antisérum contre le peptide consensus.

5 62. Trousse selon la revendication 60 ou 61, caractérisée en ce que l'autre souche HIV est une souche HIV-LAI.

63. Procédé de discrimination entre une infection par un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O et un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M mettant en oeuvre une sérine protéase dont l'action de clivage
10 s'effectue au niveau d'un dipeptide SR et comprenant la détection d'un clivage ou d'un non-clivage de la boucle V3 de la gp 120 du rétrovirus selon que ce rétrovirus est un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O ou un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M.

64. Lysat viral tel qu'il est obtenu par lyse des cellules
15 infectées par un virus selon la revendication 58 ou 59 ou par un virus VIH-1 (VAU).

65. Extrait protéique de souche VIH-1 O (O_{UR}) contenant notamment un peptide antigénique selon l'une quelconque des revendications 6 à 22, ou de souche VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O (VAU)
20 contenant notamment un peptide antigénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

66. Souche bactérienne déposée à la CNCM le 20 octobre 1994 sous le numéro d'accension I-1486.

67. Composition pour la détection et la discrimination dans
25 un échantillon biologique entre un rétrovirus VIH-1 sous-groupe M et un rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, comprenant un mélange de deux catégories de peptides, la première étant ceux identifiés dans la revendication 49.

68. Peptide selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il consiste en un peptide dont la séquence en acides aminés est contenue, soit dans l'une des séquences suivantes :

IGGHQGALQ (23)

5 REPTGSDI (24)

soit dans une séquence immunologiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés consécutifs de l'une desdites séquences.

69. Peptide selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il
10 consiste en un peptide dont la séquence en acides aminés est contenue, dans la séquence d'acide aminés suivante :

INDEAADWD (25)

soit dans une séquence immunologiquement semblable correspondante, ce peptide comportant au moins 4 acides aminés
15 consécutifs de ladite séquence.

70. Acide nucléique codant les peptides des revendications 68 et 69.

71. Composition comprenant au moins un acide nucléique selon la revendication 70.

20 72. Utilisation d'au moins un acide nucléique selon les revendications 70 et 71 pour la détection et la discrimination entre des souches VIH-1 groupe M et HIV-1 groupe O.

ISOLAT PRIMAIRE HIV-1

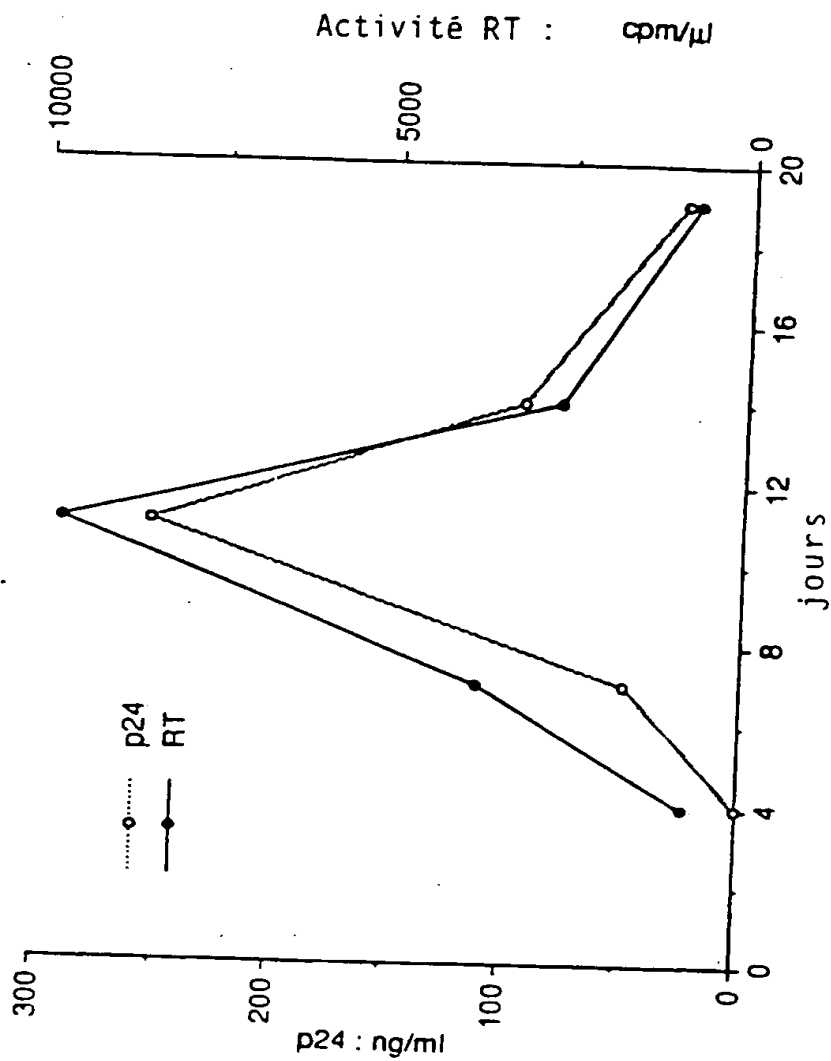


FIGURE 1A

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISAVEP

HIVvau

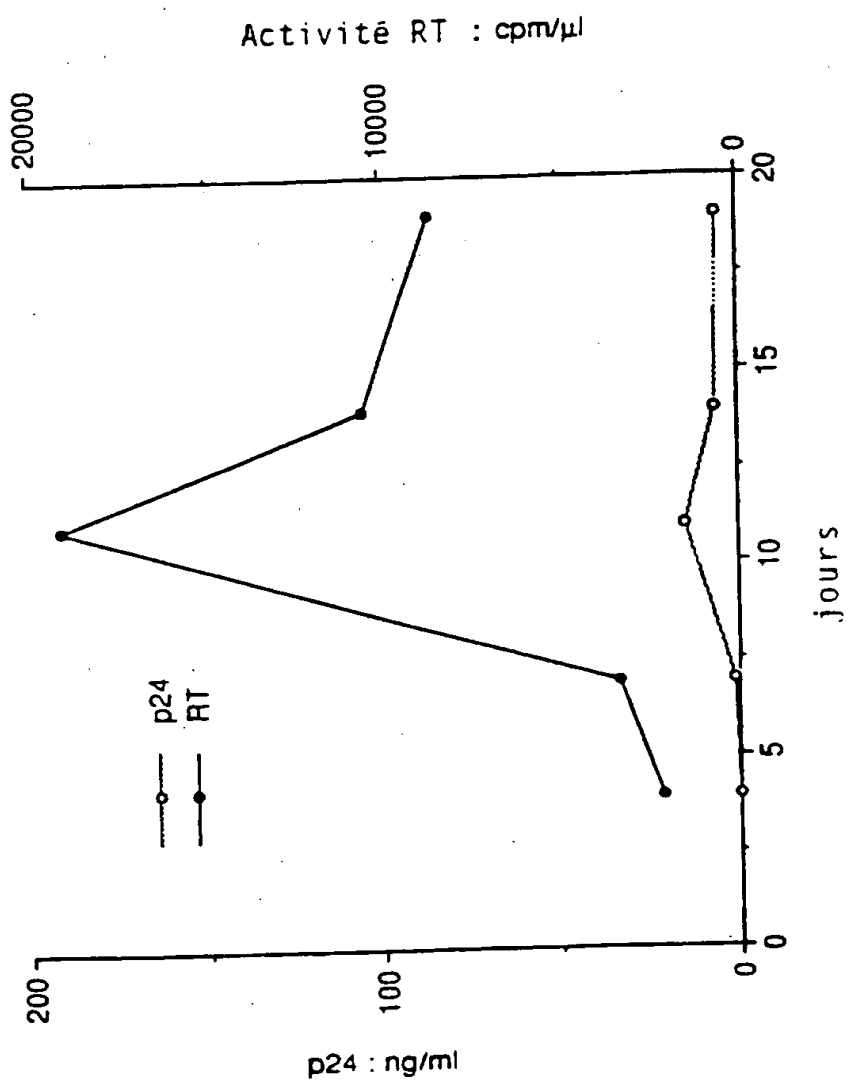


FIGURE 1B

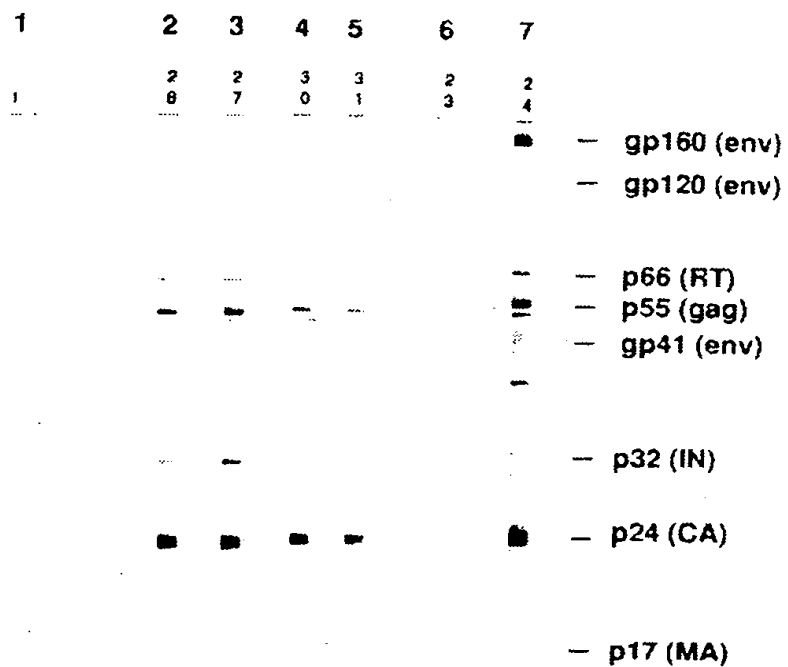


FIGURE 2

Peptide signal		
vau	1	MTAIMKAMGKRRKLGWCLILALIPCLSCNQLYATVYSGVPVWEDA 48
lal	1	MRVKEKYQHWRGKKGW TMLLGILMICSATEKLWVTVYGYGVPVWKEA 48
vau	49	KPTLFCASDANLTSTEQHNIAWQACVPTDPSPEYELKNVTGKFNWKN 98
lal	49	TTTTFCASDAKAYDTEVHNWATHACVPTDPNPQEVVLNVNVTENFMMWKN 98
vau	99	YIVDQMHEIDIIDLDQSLKPCVQMTFLCVQMNCIDIKNSINTNSPLNSN 148
lal	99	DMVEQMHEIDIISLDQSLKPCVKLTPLCVSLKCTDLGNATNTSSNTNSS 148
vau	149	NTK.....EVKQCDENVTTVLKDKQEKQKQALFYVTDLVKINATSNETMY 192
lal	149	SCEMMMEKGEIKNCSEFNISTSRGKVQKEYAFYKLDIIPID..NDTTSY 196

FIGURE 3A

```

vau 193 RLINCNSTTIRQACPKVSFEPIPIHYCAPAGCAIFKCNETGNGTGLCKN 242
    |..|..| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 197 TLTSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNKTFNGTGPCTN 246

vau 243 VTVVTCTHGKPTVSTQLILNGTLTKGNITIMGNISDSGENILITLNTN 292
    |..| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 247 VSTVQCTHGIRPVVSTQLLLNGSLAEEVWIRSANFTDNAKTIIVQLNQS 296

    Boucle v3

vau 293 ITIACERPGNQTIOKIMAGPMAYSMALSNTKGDIRAAYCNYSATDWNKA 342
    :..|..|..| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 297 VEINCTRPNNNTRKSIRIQGPCRAFTVIGKIGNMHOAHCNISRAKWNAT 346

vau 343 LKNITERYLELVEYNQTDVTMKFGNHSGEDAETNFFENCHGEFFYCNTN 392
    ||..|..| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 347 LKQIASKLREQFGNNKTI...FKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNST 393

vau 393 RLFNHTFSCKKNNMTNNKINCTNISNNSNGTQAI..PCRLRQVVVDWMRGG 440
    .| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
la1 394 QLFNSTWF.....NSTWSTEGSNTEGSDTITLPCRICKQFINMWQEVG 436

```

FIGURE 3B

vau 441 SGLYAPPIGNLVCRSNITGMILQLDTPWNKTHPNSTTLRPGGGDMKDIW 490
::| | | | | . : | . | | | | | : | | . | . . | . | | | | | : |
lal 437 KAMYAPPISGQIRCSSNITGLLLTRDGGNNN..GSEIFRPGGGMDRONW 484

gp120 ← gp41

vau 491 RTQLFKYKVVRVKPFSVAPTkiARPTIGTRSHREKRAAGLAMFLGLSA 540
| . : | | | | | : : | . | | | | | | . . . : | | | | | . : | | | | | : |
lal 485 RSELYKYKVVKIEPLGVAPTkaRRVV...QREKRAVGIGALELGLFLGA 530

vau 541 AGSTMGAAATALTVRTQHLIKIVQQQNLLRAIQAOQHLLRPSVWGIRQ 590
| | | | | | . | | | | | . : | | | | | : | | | | | : | | | | | : | | | | | : |
lal 531 AGSTMGARSMILTVOARQLLSGIVQQQNLLRAIEAQHLLQLTVMGIKQ 580

Epitope immunodominant

vau 591 LRARLLALETFIQNQOLINLWGEKNRLICYTSVKWNKTWGGDN.ESIWDE 639
| . | | | | | : | . . | | | | | : | | | | | : | | . | . . . | | : :
lal 581 LQARILAVERYLKDGQLLGWCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLQEIWN 630

FIGURE 3C

```
vau 640 LTWQWDQQINNVSFFIYEKIQEAQEQQEKNEKELLEDEWASIWNLDI 689  
:| | :| | :| | | | | .| | :| | .| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| |  
la1 631 MTMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQOEKNEQELLELDKWASLWNWFNI 680
```



```
vau 690 TKWLWYIKIAIIIVGALIGVRVVMIVLVKNIRQGYQPLSLQIPIOQQA 739  
|. | | | | | | | | | | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| |  
la1 681 TNWLWYIKIFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLTPR 730
```



```
vau 740 EVGTPGGTGEGGGDEDRRWTPLPQGFHLHLYTDLRITILWIYHLLSNLA 789  
:| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| |  
la1 731 GPDPEGIEEEGERDRDRSIRLVNGSLAIWDDLRSCLFSYHRRLDLL 780
```



```
vau 790 SEIQKLIRHLGLGLWIIGORTIEACRLFKAIIQYWLOELQTSATNLLDTV 839  
:| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| |  
la1 781 LIVTRIVE.....LLGRRGWELKYWNLLQYWSQELKN SAVSLLNAT 823
```



```
vau 840 AVAVANWTDSITLGISGRGILNIPRRIROGLERLLL 877  
| :| | | | | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| | :| |  
la1 824 AIAVAEGTORVIEVVOGACRAIRHIPRRIROGLERILL 861
```

FIGURE 3D

HIV-1lai	RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGKLIC
HIV-1Z321	-----I--
HIV-1eli	-----H--
HIV-1JRCSF	-V-----M-----
HIV-1WMJ	-V-----R-----
HIV-1NDK	-V-----R-----RH--
HIV-1mal	-V-----Q--R--M-----H--
SIVCPZGAB	-L-----Q---I--L-----AV-
vau	-L--L-TFIQN----NL---KNR---
mvp5180	-LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----
ant70	-L--L-TL-QN----SL---K---V-
HIV-2rod	-VT-I-K--Q--AR-NS---AFRQV-
HIV-2D194	-VT-I-K-----AQ-NS---AFRQV-

FIGURE 4

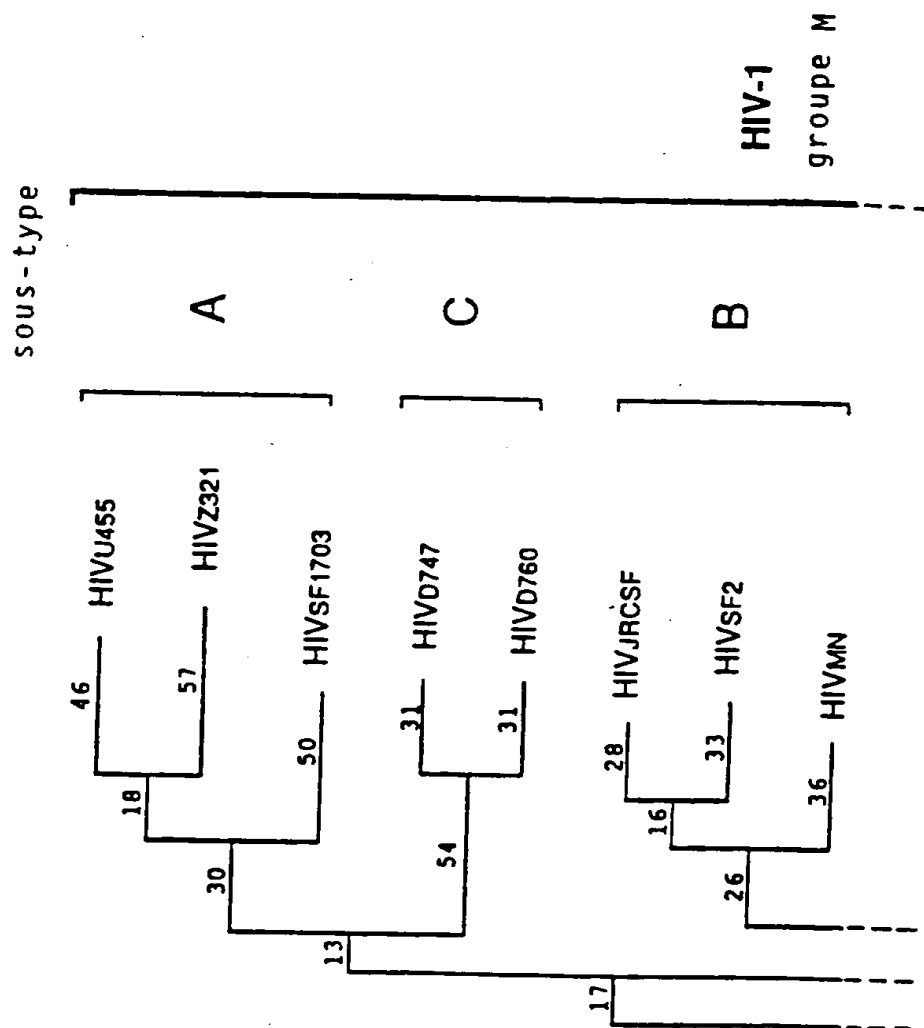


FIGURE 5A

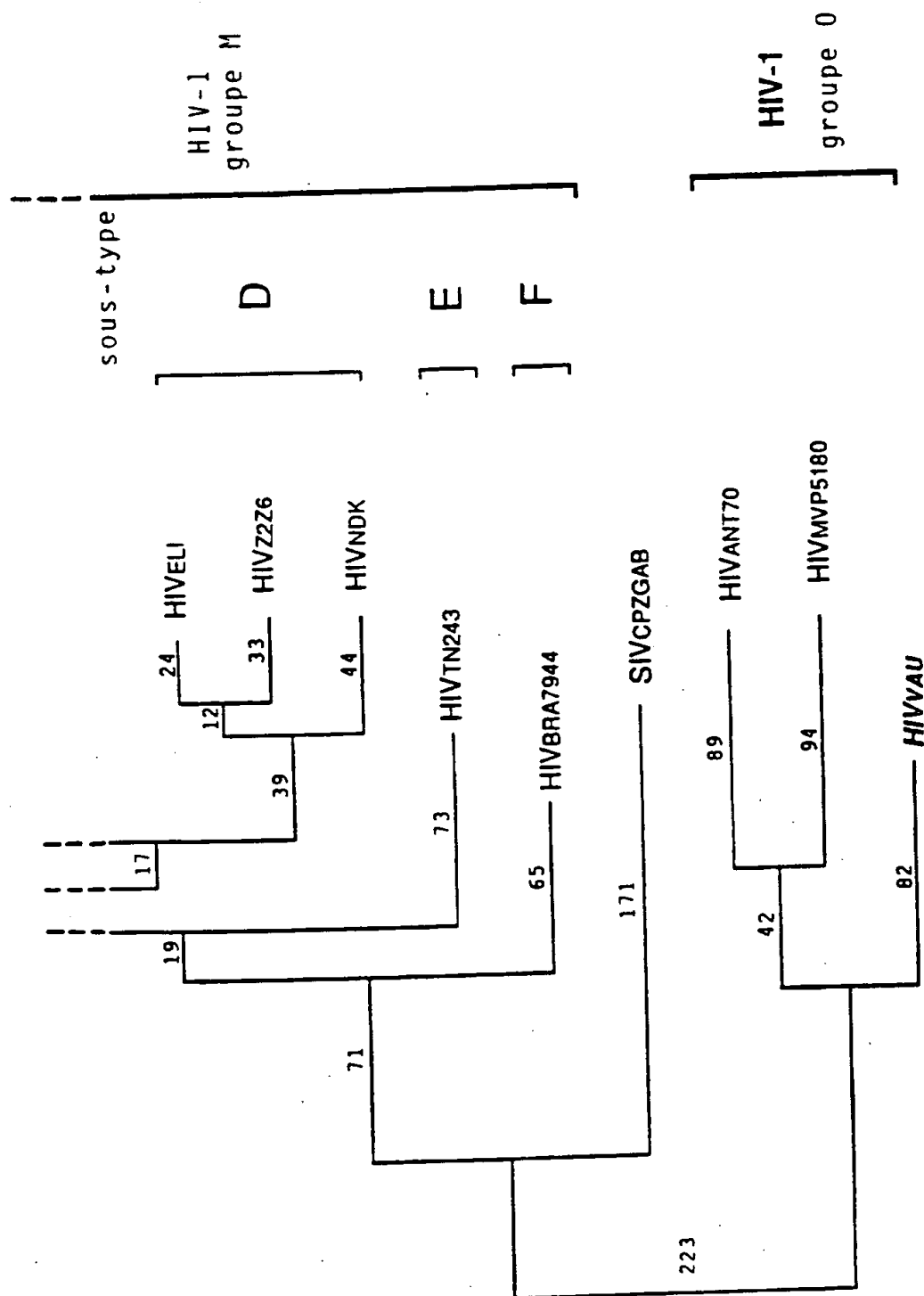


FIGURE 58

Séquence d'ADN 2631 b.p. ATGACAGCGATT ... CGACTCCTGTGTTA

linéaire

1	ATGACAGCGA	TTATGAAAGC	AATGGGGAAG	AGGACACAGG	AGTTAGGGAT	CTGGTGCTTG	ATTTGGCTT	TGATAATCCC	ATGTTTGAGC	TGTAAACCAAC	100
101	TATATGCCAC	AGTCTATTCT	GGGTACCTG	TATGGGAAGA	TGCAAAACCA	ACATTGTTCT	GTGCTTCAGA	TGCTAACCTG	ACAAGCACTG	AACAGCATATA	
201	TATTTGGGCA	ACACAAGCCT	GTGTTCCAC	AGACCCAGT	CCAAATGAAT	ATGAGCTAA	AAATGGACA	GGTAAATTC	ATATATGGAA	AAATTATATA	
301	GTAGACCAAA	TGCACGAAGA	CATTATAGAT	TTGTGGGACC	AGAGTTTAA	ACCTTGTTG	CAATGACTT	TCTTGTTG	ACAAATGAAT	TGTACAGATA	
401	TCAAAATAG	TATTAATACC	ACAAACAGTC	CCTTAAACTC	AAACAATACA	AAAGAGGTGA	AACAGTGGA	CTTAAATGA	ACTACAGTGC	TCAAGAGCAA	
501	ACAGGAGGAA	AAACAGGCTC	TATTCATGT	GACAGATTG	GTTAAGATT	ACGCCACATC	AAATGAAACA	ATGATAGAT	TAATTAATG	TAACTCCACA	
601	ACCATCAGG	AGGCTGTCC	AAAGGTATCT	TTTGAGCCCA	TTCCCATACA	CTATTGIGCT	CCAGCGGGAT	GTGCCATCTT	TAAAGTGAAT	GAAACAGGAT	
701	TAAATGGAAC	AGGCTCTG	AAACAGTTA	CAGTAGTTAC	TTGTACACAT	GGCATCAAAC	CAACAGTAA	TACCCAACTA	ATACTAAATG	GGACACTCTC	
801	TAAAGGAAT	ATAACAAATCA	TGGGAAGAA	TATTTAGAC	AGTGGGGAGA	ACATCCTAAT	AACCCCTAAT	ACTAATATA	CAATAGCATG	TGAGAGACCA	
901	GGAAATCAGA	CAATACAA	GATAATGGCA	GGTCCAATGG	CTTGGTACAG	CATGGCCCTT	AGTAATACA	AGGGGATAC	AAGGGCAGCT	TATTGTAAT	
1001	ATAGTGGCAC	TGACTGGAAC	AAAGCCTTAA	AAACATTAAC	TGAAGATAT	TTAGAACCTG	TAGAAATATA	TCAAACCTGAT	GTTACCATGA	AAATCGGTAA	
1101	TCACAGTGGT	GAAGATGCAG	AAAGTAACAA	TTTCTTTTT	AACTGTGATG	GAGAAATCTT	TTATTGTAA	ACAAATCGGC	TGTTTAACTA	TACCTTTTCC	
1201	TGCAAGAGA	ATATGACCA	TAACAGATC	AAATGTACTA	ATATTAGCAA	TAATAGCAAT	GGCACTCAGG	CAATACCTTG	CAGGTTGAGA	CAAGTAGTAA	
1301	GGGACTGGAT	GAGGGAGGA	TCGGGACTTT	ATGCACCTCC	CATCCCAGGA	AACCTAGTAT	GCAGGTCAAA	CATACTGGA	ATGATTTCTAC	AAATGGACAC	
1401	GCCATGGAA	AAACACATC	CTAACAGCAC	CACCTTAGA	CCAGGAGGG	GAGATATGAA	AGATATATGG	AGAACTCAAT	TGTTCAATA	TAAAGTAGTA	
1501	AGAGTAAAC	CTTTAGTGT	AGCACCAACA	AAAATTGCAA	GGCCAACTAT	AGGAACTAGA	TCTCATAGAG	AGAAAGAGC	AGCAGGTTTG	GCAATGCTAT	
1601	TCTTGGGAT	TCTAAGTGCA	GCAGGAAGCA	CTATGGGCG	AGCGCAACA	CGGCTGACGG	TACGGACCCA	GCATCTGATA	AAGGTATAG	TGCAACAGCA	
1701	GGATAACCTG	CTAAGAGCAA	TACAGGCCCA	GCACACCTTG	CTGAGGCCAT	CTGTATGGGG	TATTAGACAA	CITCCAGCTC	GCCTGCTAGC	CITTAGAAACC	
1801	TTTATACAGA	ATCAGCAACT	CCTTAACCTG	TGGGGCTGCA	AGATAGACT	AACTGCTAC	ACATCAGTAA	AGTGAATAA	AACATGGGA	GGAGATATG	
1901	AAICAAATTG	GGATGAGTTA	ACATGGCAGC	AGTGGGATCA	ACAGATTAAC	AACGTAACT	CTTCAATATA	TGAAATAA	CAAGAGGCAC	AAGAACAA	
2001	GGAGAAAT	GAGAAAGAAT	TGCTGGAGTT	AGATGAATGG	GCCTCTATT	GGAAATGGCT	TGACATAACT	AAATGGTTG	GGTATATAA	AATAGCTATA	
2101	ATCATAGTAG	GAGCACTAAT	AGGTGTAAGA	GTAGTTATGA	TAGTACTTAA	TCTAGTAAAG	AACATTAGGC	AGGATATCA	ACCCCTCTCG	TTACAGATCC	
2201	CCATCCAA	ACAAGCGGA	GTAGGAACCG	CAGGAGGAC	AGGAGAGGA	GGTGGAGACG	AAGACAGGG	CAGGTGACT	CCATGGCCG	AAGGTTCTT	
2301	GCATCTGTTG	TACACGGACC	TCAGGACAAT	AACTCTGTGG	ATTTACACC	TCITGAGCAA	CTTAGCCTCA	GAGATCCAGA	AGTTGATCAG	ACACCTGGGA	
2401	CITGGACTAT	GGATCATAGG	GCAGAGGACA	ATTGAGCTT	GCAGACTCTT	TAAAGCTATA	ATACATACT	GCTACAGA	ATTGCAACT	AGTGCTACAA	
2501	ATCTACTAG	TACTGTTGCA	GTGGCAGTTG	CTAATTGGAC	TGACAGCACA	ATCTTAGGCA	TACAAAGCAT	AGGGAGAGGG	ATTCTTAACA	TACCAAGNAG	
2601	GATTAGACAG	GGCCTTGAAC	GACTCCTGTT	A							

FIGURE 6

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISAEP

12/37

1	GCAGAGACAG	10		GACAGGAAAC	20		TGCCTACTTC	30		CTGTTAAAAT	40		TAGCAGCAAG	50		ATGGCCTATT	60		AAAATACTAC	70		ATACAGACAA	80
81	TGGGCCTAAC			TTTACAAGTG			CAGCCATGAA			AGCTGCATGT			TGGTGGACAA			ACATACAACA			TGAGTTTGGG			ATACCATACA	
161	ATCCACAAG			TCAAGGAGTA			GTAGAAGCCA			TGAACAAGGA			ATTAAATCA			ATCATACAGG			TGAGGGACCA			AGCAGAGCAC	
241	TTAAGGACAG			CAGTACAAAT			GGCAGTATTT			GTTCAACAAT			TTAAAGAAA			AGGGGGGATT			GGGGGGTACA			CTGCAGGAGA	
321	GAGATTAAATA			GACATATTAG			CATCACAAAT			ACAAACAACA			GAACCTACAA			AACAAATTTT			AAAAATTCAA			AATTTTCGGG	
401	TCTATTACAG			AGACAGCAGA			GACCCATATT			GGAAAGGACC			GGCACAGCTC			CTG							
		10			20			30			40			50			60			70			80

FIGURE 7

REGION GAG

	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特	特
DUR	qgqmvhqalsprtl	na	wk	avee	kafn	peip	mfmal	segav	pydin	vm	lna	iggh	qgal
ANT	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MVP	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LAI	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
MAL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CPZ	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FIGURE 8A

	#	#	#	#	#	#	#
DUR	qvl	ke	in	de	aa	dw	dr
ANT	ah	pp	qg	pl	pp	qg	ir
MVP	pt	pp	vt	pt	gs	di	ag
LAI	tt	st	qq	eq	il	wt	ra
MAL	gn	pi	pn	qg	il	wt	ra
CPZ	gn	pi	pn	qg	il	wt	ra

FIGURE 8B

16/37

REGION DE LA BOUCLE V3 DE GP120

-----YK---QRTG- ---O-LX- THR-I-DI -----	MAD
CTRPNNTRKSIRIQPGRAFT IGK IGNM ROAHC	LAI
-----NR-S- -----H-- TKQ-I-DI -----	OYI
-A--YQ---QRTP- -L-QSLY- TR_SRSII G----	ELI
-----G-----RGIHF ---QALY- T-- -V-DI -R-Y-	MAL
-S--Y-TRKNIRYSI-S-QAFYV T---I-DI -Q----	455
-H--G-----GE VQI---MTFYN -ENVV-DT -S-Y-	CPZ
-E--QI_DIQE_MRI-- M-WYSMG--GTA--S_S---Y-	ANT
-I-EGIAEVQD-YT -- MRWRSM TLIRSNT S-V-Y-	MVP
-E--G-QTIQK-MA -- M-WYSMALSNK-DT_S-A-Y-	VAU
-V--G--SV-E-K- -- M-WYSMQ-EREGKGANS-T-F-	DUR
C*R*****I****GP_M*W*SM*****SR*A*C	HIV-O Consensus
CVRPGNNSVKEIKI_GP_MAWYSMQIEREGKGANSRTAFC	DUR

FIGURE 9A

REGION IMMUNODOMINANTE DE GP41

	[-----]
	[-----]
MAD	-V-----Q-----H-----T-----S-----
LAI	RILAVERYLKDQQLLGINGCSGKLICTTAVPWNASWS
OXI	-V-----
ELI	-----T-----
MAL	-----H-----N-----S-----
455	-V-----Q-R-----M-----H-----F-----S-----
CPZ	-V-----Q-----T-----S-----
	-L-----Q-----I-----L-----AV-Y-T-----N-----P
ANT	-L--L-TL-QN---SL---K---V-Y-S-K--RT-I
MVP	-LQ-L-TLIQN--R-NL---K-----Y-S-K--RT-I
VAU	-L--L-TFIQN---NL---KNR---Y-S-K--KT-G
DUR	-L--L-TLMQN---NL---R--A--Y-S-Q--ET-G
HIV-O Consensus	RL*ALET**QNQQ*L* ^T LHGC****CYTSV*WN*TM*
DUR	RLLALETLMQNQQLLN ^T LNGCRGKAICYTSVQWN ^T ETWG
	[-----]
	[-----]

FIGURE 9B

CAGGACAAATGGTACATCAGGCCATCTCCCCAGAACTTTATATGTATGGTAAAGGCA
GTAGAGAAAAGGCCTTTAACCCCTGAAATTATCCCTATGTTTATGGCACTATCAGAAAGGA
GCTGTTCCCTATGATATCAATGTTATGCTAAATGCCATAGGAGGACACCAAGGGGCTTTA
CAAGTATTAAAGAAGTAATCAATGATGAAGCAGCAGACTGGGATAGAGCTCACCCACAA
CAGGAGGGCCGTTACCAACAGGCGAGATAAGGAAACCAACAGGAAGTGACATTGCTGGA
ACAACTAGCACACAGCAGCAAGCAAAATTCTCTGGACTACTAGGCAAGTAACCCATATCCCA
GTTGACACATCTATAGGAAATGGATAGTGTGGGTCTAAACAAATGGTAAAAATGTAT
AGTCCAGTGAGCATCTTAGATATTAGGCGAGGACCAAAAGAACCATTTAGAGATTATGTA
GACAGGTTCTACAAAACATTAAAGAGCTGAGCAG

REGION GAG DE HIV 1-0 SOUCHE DUR : 513 PAIRES DE BASES

= SEQ ID N° 9

QQQMVFHQALSPRTLNAWVKAVEEKAFNPEIPMFMALSEGAVPYDINVMNLNAJGGHQGAL
QVLKEVINDEAADWDRAHPQQAAGPLPGQIREPTGSDIAGTTSTQEQILWTTTRAGNPIP
VGDITRKWIVLGLNKMVMKMYSPVSILDIRQGPKEPRDYVDYFVKTLRAEQ

REGION GAG DU VIRUS HIV 1-0 SOUCHE DUR : 171 ACIDES AMINES

FIGURE 10

ATTCCAATACACTATTGTGCTCCAGCAGGATATGCTATCTTTAAATGCAACAACGAGGAG
 TTTACTGGAAAAGGCCCATGTAAACAACATTTTCAGTAGTTACCTGTACACAGGGTATCAAG
 CCAACAGTAAGCACTCATCTAATATTCAATGGGACAATCTCTGAAAGAAAATAAGAAATT
 ATGGGAAAGAACATCTCGAGCAACTCAGGTAATCTCTAGTACCCCTAAATTTCTACTATA
 AACATGACCTGTGTGAGGCCAGGAAATAATTTCAGTACAGGAGATAAAATAGGTCCAATG
 GCTTGGTACAGTATGCAAAATTGAGCGAGAGGGAAGGAGCAAAATTCAGGAACAGCTTTT
 TGTACCTATAATGCCACGGACTGGAGAAAACCTTGCAAGGGATAGCTGAAAGGTATTTA
 GAACTTGTAATAAAACAAGTCCGACTGAAATAATGTTCAATAAAGCAATGGTGGAGAT
 GCAGAAATAACCCGTTTGCATTTTAACTGTCATGGAGAAATCTTTT

Boucle V₃ de gp120 souche DUR : 525 paires de bases
 = Seq ID N° 10

IPHHYCAPAGYAIFKCNNEEFTGKGPCNNISVVTCTQGKPTVSTHLIFNGTISERKIRI
 MGKNISSNSGNIL VTLNSTDNMTCVRPGNNSVQEKIGPMAWYSMQIEREGKGANSRTAF
 CTYNAIDWRKTLQIAERYLELVNKTSPTEIMFNKSNNGGDAEITRLHFNSCGEFF

Boucle V₃ de gp120 souche DUR : 175 acides aminés

FIGURE 11

ATAGTGCAACAGCAGGACAACCTGCTGAGGCAATACAGGCCAGCAACATCTGCTGAGG
 TTATCTGTATGGGTATTAGACAACCTCCGAGCTCGCTGCTAGCCTTAGAAACCCCTTATG
 CAGAA TCAGCAACTCCTAAACCTGTGGGTGTAGAGGAAAGCAATCTGCTACACATCA
 GTACAATGGAATGAACATGGGAGGAAATGACTCAATTTGGGACAGGTTAACATGGCAG
 CAATGGGATCAACAGATAGCCAATGTAAAGCTCTTTATATATGACAAAAATACAAGAAGCA
 CAAGAACAACAA

Séquence ADN de la région immunodominante de GP41 de

HIV 1-0 DUR : 312 paires de bases

= Seq 10 N° 11

IVQQDNLLRAIQAAQQLRLRLSVWGIRQLRARLLALETLMQNQLNLWGCRGKAICYTS
 VQWNETWGGNDSIWDRLTWQQWDQQIANVSSFTYDKIQEAQEQQ

Séquence ADN de la région immunodominante de GP41 de

HIV 1-0 DUR - protéine prédite : 104 acides aminés

FIGURE 12

AMORCES SPECIFIQUES DU TYPE HIV-0

dur V3a	ATT-CCA-ATA-CAC-TAT-TGT-GCT-CCA-3'
dur V3r	AAA-GAA-TTC-TCC-ATG-ACT-GTT-AAA-3'
dur 41a	GGT-ATA-GTG-CAA-CAG-CAG-GAC-AAC-3'
dur 41r	AGA-GGC-CCA-TTC-ATC-TAA-CTC-3'

FIGURE 13A

Positions des amorces :

dans HIV MVP5180

dur V3a	6896 à 6919
dur V3r	7400 à 7423
dur 41a	7934 à 7957
dur 41r	8292 à 8302

dans HIV ANT70

dur V3a	6896 à 6920
dur V3r	7392 à 7415
dur 41a	7917 à 7940
dur 41r	8256 à 8276

dans HIV1 VAU

dur V3a	640 à 663
dur V3r	1138 à 1161
dur 41a	1684 à 1707
dur 41r	2026 à 2046

FIGURE 13B

V3	
HIV1-M Consensus	Négatif
HIV1-M MAL (Africain)	Négatif
HIV1-M CIV-CPZ (Chimpanzé)	Négatif
HIV1-O MVP5180	Négatif
HIV1-O ANT70	Positif

GP41	
HIV1-M Consensus :	
- Classique Pasteur	Négatif
- Etendu à droite Innogenetics	Positif faible
HIV1-O MVP5180 :	
- Innogenetics	Négatif
- Etendu à gauche Behring	Positif
HIV1-O VAU	Positif

FIGURE 14

COMPARAISONS NUCLEOTIDIQUES

EXPRIMEES EN POURCENTAGE DE DIFFERENCE

GP41 (sur 330 bases)							
LAI	0						
MAL	11	0					
CPZ	33	31	0				
MVP5180	39	38	38	0			
ANT70	36	39	37	15	0		
VAU	39	38	38	14	14	0	
DUR	38	36	37	13	15	11	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

FIGURE 15A

V3 (sur 558 bases)							
LAI	0						
MAL	19	0					
CPZ	37	34	0				
MVP5180	46	43	45	0			
ANT70	45	44	43	23	0		
VAU	44	41	41	24	24	0	
DUR	46	43	42	25	22	24	0
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

gag (sur 520 bases)							
LAI	0						
MAL	9	0					
CPZ	21	25	0				
MVP5180	24	26	25	0			
ANT70	25	25	24	10	0		
DUR	25	26	25	9	10	0	
LAI		MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR	
				5180	70		

FIGURE 15B

COMPARAISONS PROTEIQUES

EXPRIMEES EN POURCENTAGE DE DIFFERENCE

GP41 (sur 109 acides aminés)							
LAI	0						
MAL	17	0					
CPZ	33	28	0				
MVP5180	42	40	41	0			
ANT70	42	45	39	22	0		
VAU	44	47	45	19	21	0	
DUR	44	42	39	17	17	14	0
LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR	
			5180	70			

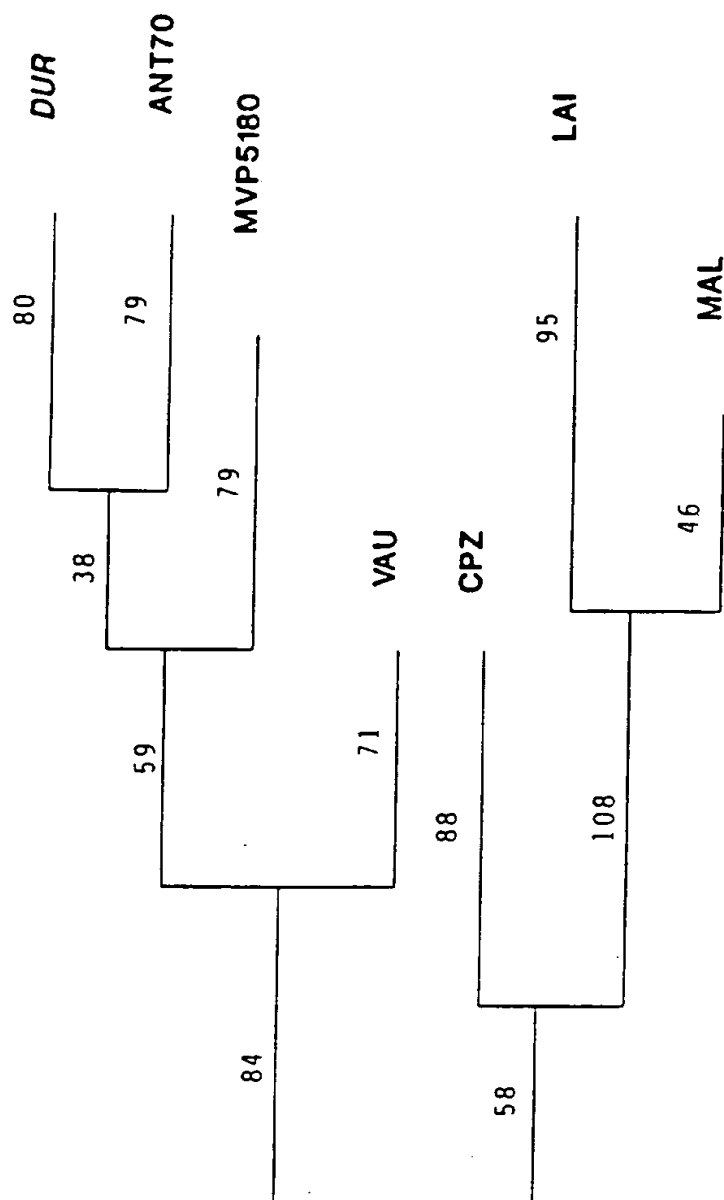
FIGURE 16A

27/37

V3 (sur 186 acides aminés)							
LAI	0						
MAL	31	0					
CPZ	46	39	0				
MVP5180	55	50	59	0			
ANT70	55	50	55	36	0		
VAU	55	51	55	39	36	0	
DUR	56	51	56	39	35	42	0
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	VAU	DUR
				5180	70		

gag (sur 174 acides aminés)							
LAI	0						
MAL	6	0					
CPZ	11	14	0				
MVP5180	21	23	18	0			
ANT70	21	24	19	6	0		
DUR	22	22	19	7	9	0	
	LAI	MAL	CPZ	MVP	ANT	DUR	
				5180	70		

FIGURE 16B

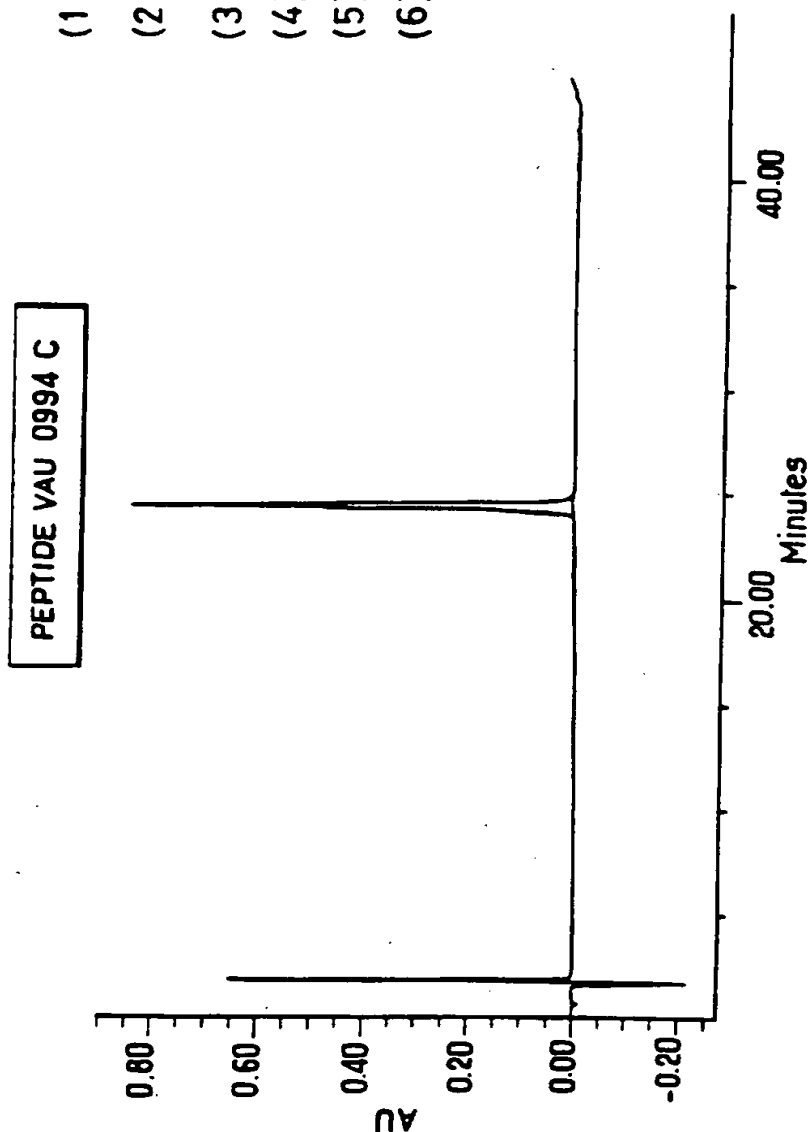


Arbre phylogénétique de V3
(Programme Treealign, J. Hein, sur Bisance, Citi2)
(sur 171 acides aminés.)

FIGURE 17

29 / 37

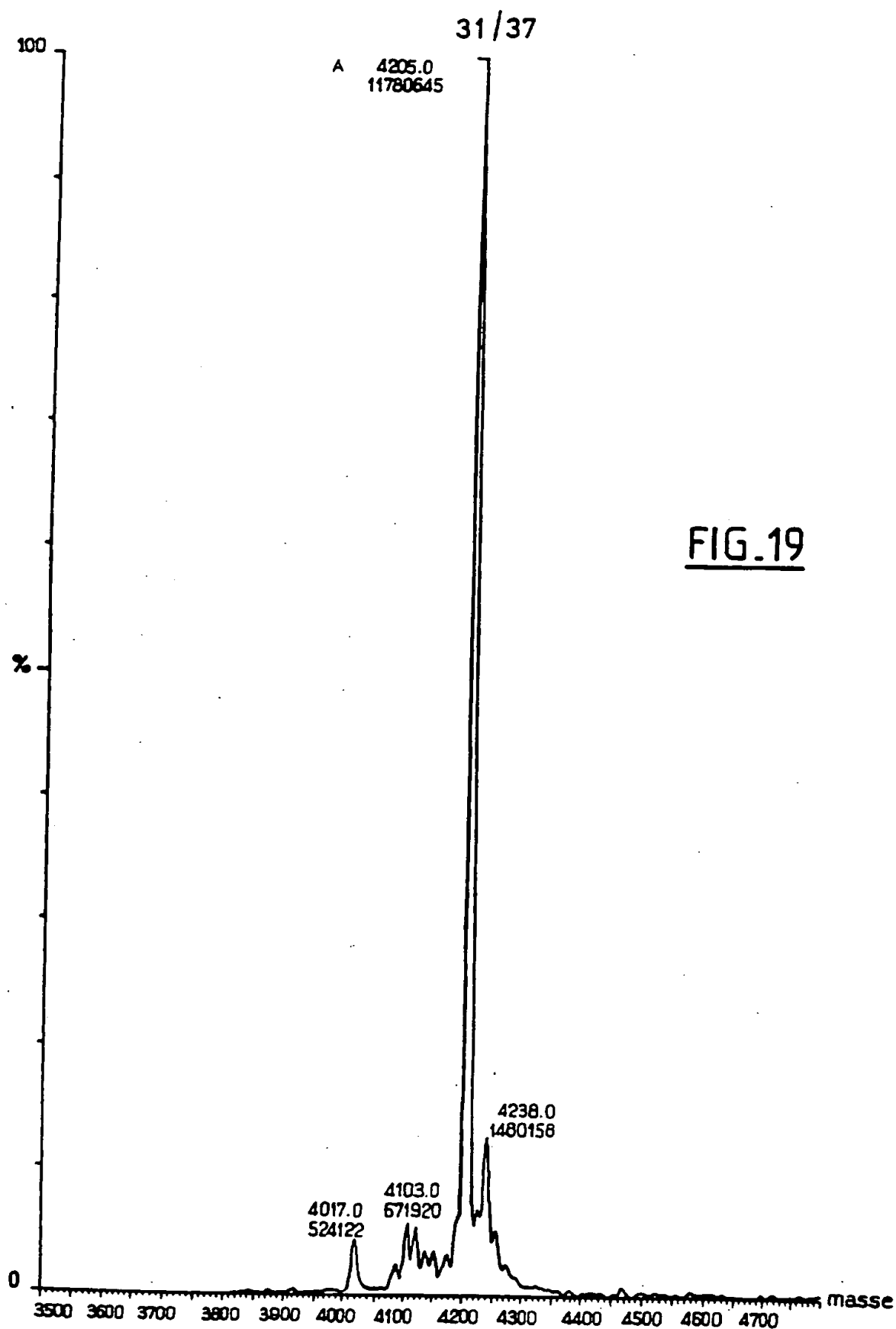
- (1) Nom de l'échantillon :
Vau7101550
(2) Nom de la méthode :
VauRepMet 3
(3) Procédé : FvauPrcMet 3D
(4) Durée d'injection : 45.0min
(5) Volume : 50.00 ml
(6) Trousse : MSHV15_5030mlml

FIG. 18A

resultats Chromato

Temps de rétention (min)	Temps. initial (min)	Temps. final (min)	% Surface	Int Type
24.482	23.898	24.932	100.00	BB

FIGURE 18B

FIG.19

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISAVEP

SEQUENCE : RLLALETFIQNQQLNLWGCKNRLICYTSVKWNKT

POIDS MOLECULAIRE : 4210

CONTROLES ANALYTIQUES : > 95% par HPLC et spectrométrie de masse

FIGURE 20

**ETUDE DE L'IMMUNOREACTIVITE DU PEPTIDE MIMANT L'EPITOPE
IMMUNODOMINANT DE LA GP160 SEQUENCE VAU (SOUS TYPE O)**

VS=0.1 RATIO	PEPTIDE VAU 2µg/ml
Sérums HIV1 (panel BB1)	
B01 N° 12	0.80
B01 N° 13	0.40
B01 N° 15	0.80
PRB911 K6	0.20
Sérums HIV1 (Roumanie)	
stade 3 / 4	
3989	9.50
5116	8.60
Sérums HIV1 (panel AFM)	
Sous type O	
MAA	>30
LOB	>30
HAM	>30
DUR	12.50
Sérum HIV1 (Reims)	
Sous type M?	
MAD	0.20

FIGURE 21A

Suspension de sous type O (Centre Pasteur Yaoundé)	
950	0.60
3372	>30
3381	28.80
1507	28.70
3167	>30
2628	28.10
1060	0.60
4020	0.30
4783	0.30
5322	0.40
6661	0.50
5527	0.30
5863	25.00
5969	>30
6487	>30
6509	0.70
6782	>30
6453	27.30
3826	1.50
Sérums HIV2	
BERT	0.30
PAOL	4.50
RIV	15.80

Protocole EIA indirect ; 3 X 30min type Genelavia Mixt

Sérums négatifs	
N=48	
Moyenne	0.022
DS	0.007
Moyenne +12DS	0.107
VS	0.100

FIGURE 21B

SYNTHESE DES RESULTATS OBTENUS SUR LES SERUMS AFRICAINS

	RESULTATS WB1									
	GP 160	GP 120	P 68	P 55	GP 41	P 40	P 34	P 25	P 18	
3381	++	+-	+				++	+	+	POS
1607	+	+-					+-	+-		POS
2628	+-		++	++		+	+	++	++	POS
3167	++	+	++	++	+	+	++	++	++	POS
3372	++	+-	+	++	+	+	++	++	+-	POS
5453	++	+-	+	+	+-	+	+	+	+	POS
5863	++	+-	+	+	+-	+-	+	+	+	POS
5969	+-		+	+		+	+	+		IND
6487	++		+	+			+	+-	+-	IND
6782	++		+	+	+	+	+	+		POS
950	+-		+-				+-	+-	+-	IND
1060	+-							+-	+	IND
5527										?
6509	++		+-				+-			IND
6661	+							+		IND
4020=	+							(+-)		IND
SEMT										
4783=	+-							+-	+-	IND
5322										
3826								+-	+-	IND
MAD	++	+	+	+	+	+	+	+	+	POS
DUR										
MAA										
LOB	+		++	+-			++	++		IND
HAM			+				+	+		IND

=Ratio<1

=Ratio>2

FIGURE 22A

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

	TESTS DE SCREENING (ratio : DO/VS)				
	Clonated Ind HIV1+2	GEM Ind HIV1+2	Abbott sdw HIV1+2	Murex sdw HIV1+2	Murex comp HIV1
3361	0.10	18.00	0.56	0.72	1.40
1507	0.97	14.25	3.03	5.35	0.98
2628	0.70	18.00	4.84	1.71	1.34
3167	0.38	18.30	11.89	>6	0.88
3372	0.19	18.80	11.63	3.76	0.47
5453	2.50	>20			1.70
5863	2.30	>20			1.90
5969	2.30	15.20			2.25
6487	0.32	19.70			1.90
6782	0.07	13.40			2.95
950	1.20	6.00	5.76	>6	0.68
1060	0.60	18.00	0.46	1.25	0.67
5527	0.27	2.40			0.52
6509	0.32	>16			2.14
6661	8.10	10.10			1.54
4020=	0.23	6.30	1.03	4.98	4.12
SEMT					
4783=	0.19	8.10	0.41		0.55
5322		10.90			0.52
3826		3.93		1.64	0.72
MAD	-	+	+		
DUR		>8	2.00	0.80	
MAA					
LOB		>19	2.00	2.70	1.50
HAM		>19	1.80	7.80	2.70

FIGURE 22B

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

37/37

	EIA PEPTIDES							
	Clonatec rap HIV1	39D6 HIV1B	FER HIV1B	39A HIV1B	VAU HIV1O	MVPP 5180 HIV1O	BNR 19 HIV1O	PEPTI- LAV1-2
3361	+				28.8	25.80	NT	
1507	douteux			8.4	28.7	28.80	1.7	
2628				3.6	28.1	19.30	1.2	
3167	+			>30	>30	>30	1.6	
3372	+-			2.8	>30	24.00	4.9	
6453	-	4.36	1.37	3.6	27.3		1.6	-
5863	-	1.42	0.40	1.4	25		0.5	-
5969	-	0.94	1.90	19.4	>30		0.6	+
6487	+	25.75	5.76	>30	>30		0.7	
6782	-	0.64	0.49	0.8	>30		10.3	-
950					0.6		0.4	
1060	douteux			1.9	0.6	0.40	0.6	
5527	-			4.5	0.3		0.2	+/-
6509	+			16.9	0.7		0.2	
6661	+			2.8	0.5		0.4	
4020=	?Ag-			1.15	0.3		0.5	
SEMT				1.2	0.7		0.9	
4783=				2.5	0.3		0.3	
5322				4	0.4		0.3	
3826				1.6	1.5		0.7	
MAD		0.66	2.72	26.7	0.2		>30	-
DUR		>30	>30	>30	12.5		0.2	
MAA				NT	>30		NT	
LOB		1.02	5.62	12.5	>30		>30	
HAM		0.73	0.41	13.3	>30		0.7	

FIGURE 22C

FEUILLE RECTIFIEE (REGLE 91)
ISA/EP

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

C12N 15/49, C07K 14/16, 16/10, A61K 39/21

A3

(11) Numéro de publication internationale:

WO 96/12809

(43) Date de publication internationale:

2 mai 1996 (02.05.96)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/01391

(22) Date de dépôt international: 20 octobre 1995 (20.10.95)

(30) Données relatives à la priorité:

94/12554	20 octobre 1994 (20.10.94)
95/02526	3 mars 1995 (03.03.95)

FR

FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR (FR/FR); 25-28, rue du Dr.-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CHARNEAU, Pierre [FR/FR]; 6 bis, rue des Ecoles, F-75005 Paris (FR). CLAVEL, François [FR/FR]; 94, rue de l'Assomption, F-75016 Paris (FR). BORMAN, Andrew [FR/FR]; 14, rue des Moulins, F-28210 Nogent-le-Roi (FR). QUILLENT, Caroline [FR/FR]; 110, rue de Bagneux, F-92120 Montrouge (FR). GUETARD, Denise [FR/FR]; 4 bis, rue Anselme-Payen, F-75015 Paris (FR). MONTAGNIER, Luc [FR/FR]; 21, rue de Malabry, F-92000 Le Plessis-Robinson (FR). DONJON DE SAINT-MARTIN, Jacqueline [FR/FR]; 65, avenue Victor-Hugo, F-92140 Clamart (FR). COHEN, Jacques, H., M. [FR/FR]; 17, rue de Sully, F-51100 Reims (FR).

(74) Mandataires: ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD
S.A. etc.; 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).

(81) **Etats désignés:** AU, CA, CN, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:
20 juin 1996 (20.06.96)

(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES OF HIV-1 TYPE (OR SUBTYPE) O RETROVIRUS ANTIGENS

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES D'ANTIGENES RETROVIRAUX VIH-1 GROUPE (OU SOUS-GROUPE) O

(57) Abstract

An HIV-1 type (or subtype) O retrovirus protein, or a natural or synthetic polypeptide or peptide including at least a part of said protein, which is capable of being recognised by antibodies isolated from a serum resulting from infection by an HIV-1 type O VAU strain or an HIV-1 type (or subtype) O DUR strain.

(57) Abrégé

L'invention concerne une protéine de rétrovirus VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O, ou polypeptide ou peptide naturel ou synthétique comprenant au moins une partie de ladite protéine, susceptible d'être reconnue par des anticorps isolables à partir de sérum obtenu suite à une infection par une souche VIH-1 groupe O VAU, ou une souche VIH-1 groupe (ou sous-groupe) O DUR.

PLEASE LOCK THE DOOR

[illegible][illegible]

DOMINANT REGION OF GPO

(-----)

[-----]

MRO ----- T

LAT RELAYED TO OO LIOG CONCLICT APPRASH

OAT -----

ELE -----

MAL -----

AIS -----

CDS -----

[illegible]

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/FR 95/01391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/49 C07K14/16 C07K16/10 A61K39/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	VIROLOGY, vol. 205, no. 1, 15 November 1994 pages 247-253, CHARNEAU, P. ET AL. 'Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolata: definition of a new HIV-1 group' see the whole document ---	1-5, 23-35
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 3, March 1994 pages 1581-1585, GÜRTLER, L. G. ET AL. 'A new subtype of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (MVP-5180) from Cameroon' --- -/-	1

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 March 1996

Date of mailing of the international search report

23.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 95/01391

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AIDS, vol. 8, no. 10, 1 October 1994 pages 1405-1412, NKENGASONG J.N. ET AL. 'Genomic subtypes of HIV-1 in Cameroon' see the whole document ---	1
A	EP,A,0 591 914 (BEHRINGWERKE) 13 April 1994 see the whole document ---	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 3, March 1994 pages 1586-1596, VAN DEN HAESEVELDE, M. ET AL. 'Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african Human Immunodeficiency Virus isolate' ---	1
P,X	THE LANCET, vol. 344, no. 8933, 12 November 1994 pages 1333-1334, SCHABLE, C. ET AL. 'Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group 0 infections' see the whole document ---	35,41,49
X,P	WO,A,94 28871 (ENDOCON, INC.) 22 December 1994 see the whole document ---	1,6-8
X	WO,A,90 13564 (CONNAUGHT LABORATORIES LTD) 15 November 1990 see the whole document ---	1,6-8
X	EP,A,0 284 587 (VIROVAHL S.A.) 28 September 1988 see the whole document ---	1,6-8
X	WO,A,91 09869 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, THE CHANCELLOR, UNIVERSITY OF OXFORD) 11 July 1991 see the whole document ---	1,6-8
X,P	WO,A,94 26298 (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE) 24 November 1994 see the whole document ---	1,6,12
X	EP,A,0 471 407 (MERCK & CO. INC.) 19 February 1992 see the whole document ---	1,6,12
2 3 X	WO,A,92 05266 (VIAGENE INC.) 2 April 1992 see the whole document ---	1
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01391

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,5 352 576 (HAYNES, F.H., PALKER, T.J.) 4 October 1994 see the whole document ---	1,6,12
X	EP,A,0 591 914 (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT) 13 April 1994 see the whole document ---	1,6,18
X	WO,A,94 03555 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO. LTD.) 17 February 1994 see the whole document ---	1,6,18
X	EP,A,0 290 893 (GENETICS SYSTEMS CORPORATION) 17 November 1988 see the whole document ---	1,6-8
X	EP,A,0 570 357 (KATINGER, H.W.D.) 18 November 1993 see the whole document ---	1,6
X	EP,A,0 330 359 (BIO-RAD LABORATORIES INC.) 30 August 1989 see the whole document ---	1,6-8
X	WO,A,90 15158 (INSTITUT PASTEUR, INSERM) 13 December 1990 see the whole document ---	1,6
X,P	WO,A,94 29339 (CONNAUGHT LABORATORIES LTD) 22 December 1994 see the whole document ---	1,6-8
A,P	FR,A,2 707 091 (COHEN-HAGUENAUER) 6 January 1995 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 95/01391

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 44
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although Claim 44 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the product (composition).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0591914	13-04-94	DE-A- 4233646 DE-A- 4235718 DE-A- 4244541 DE-A- 4318186 AU-B- 4880093 CA-A- 2107732 JP-A- 6225760 ZA-A- 9307371	07-04-94 28-04-94 07-07-94 05-01-95 21-04-94 07-04-94 16-08-94 29-04-94
WO-A-9428871	22-12-94	AU-B- 7101294	03-01-95
WO-A-9013564	15-11-90	CA-A- 2053921 DE-D- 69007099 DE-T- 69007099 EP-A- 0470980 ES-T- 2062521 JP-T- 4502013	04-11-90 07-04-94 01-06-94 19-02-92 16-12-94 09-04-92
EP-A-284587	28-09-88	SE-B- 468181 AU-B- 606928 AU-B- 1380788 CA-A- 1336473 CA-A- 1338028 SE-A- 8701294 SU-A- 1802871 JP-A- 2015098	16-11-92 21-02-91 29-09-88 25-07-95 30-01-96 28-09-88 15-03-93 18-01-90
WO-A-9109869	11-07-91	CA-A- 2072351 EP-A- 0510054 GB-A,B 2255093 GB-A,B 2273709 GB-A,B 2273710 US-A- 5480967	06-07-91 28-10-92 28-10-92 29-06-94 29-06-94 02-01-96
WO-A-9426298	24-11-94	AU-B- 6827894	12-12-94
EP-A-471407	19-02-92	AU-B- 642751 AU-B- 8177791 CA-A- 2048594 JP-A- 6321808	28-10-93 20-02-92 14-02-92 22-11-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/FR 95/01391

PC1/PR 93/01391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9205266	02-04-92	AU-B- 665176	21-12-95
		AU-B- 8842491	15-04-92
		CA-A- 2092195	22-03-92
		EP-A- 0549723	07-07-93
		JP-T- 6500923	27-01-94

US-A-5352576	04-10-94	US-A- 5019387	28-05-91
		US-A- 5013548	07-05-91

EP-A-591914	13-04-94	DE-A- 4233646	07-04-94
		DE-A- 4235718	28-04-94
		DE-A- 4244541	07-07-94
		DE-A- 4318186	05-01-95
		AU-B- 4880093	21-04-94
		CA-A- 2107732	07-04-94
		JP-A- 6225760	16-08-94
		ZA-A- 9307371	29-04-94

WO-A-9403555	17-02-94	JP-A- 6199687	19-07-94
		AU-B- 4760193	03-03-94
		CA-A- 2141961	17-02-94
		EP-A- 0657520	14-06-95

EP-A-290893	17-11-88	US-A- 5104790	14-04-92
		AT-A,B 208987	15-01-94
		AT-T- 105938	15-06-94
		AU-B- 625720	16-07-92
		AU-B- 1508088	03-11-88
		AU-B- 616156	24-10-91
		AU-B- 7720187	19-05-88
		BE-A- 1000811	11-04-89
		CH-A- 675728	31-10-90
		DE-A- 3727703	05-05-88
		DE-D- 3889581	23-06-94
		DE-T- 3889581	20-10-94
		ES-T- 2056075	01-10-94
		FR-A- 2603107	26-02-88
		GB-A,B 2196634	05-05-88
		IE-B- 60671	10-08-94
		JP-A- 1063392	09-03-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-290893		JP-A- 1085928	30-03-89
		LU-A- 86972	02-03-88
		NL-A- 8701950	16-03-88
		NO-A- 934897	29-12-93
		OA-A- 8652	30-11-88
		SE-A- 8703225	21-02-88
		US-A- 5166050	24-11-92
		PL-B- 161520	30-07-93
EP-A-570357	18-11-93	CA-A- 2096159	15-11-93
		DE-T- 570357	28-07-94
		ES-T- 2053413	01-08-94
		JP-A- 6293797	21-10-94
EP-A-330359	30-08-89	AU-B- 3076189	31-08-89
		JP-A- 1308299	12-12-89
WO-A-9015158	13-12-90	FR-A- 2647810	07-12-90
		EP-A- 0404625	27-12-90
		JP-T- 4505558	01-10-92
WO-A-9429339	22-12-94	AU-B- 6967394	03-01-95
		EP-A- 0702693	27-03-96
FR-A-2707091	06-01-95	AU-B- 7189394	24-01-95
		EP-A- 0659216	28-06-95
		WO-A- 9501447	12-01-95

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e internationale No
PCT/FR 95/01391

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/49 C07K14/16 C07K16/10 A61K39/21

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	VIROLOGY, vol. 205, no. 1, 15 Novembre 1994 pages 247-253, CHARNEAU, P. ET AL. 'Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolata: definition of a new HIV-1 group' voir le document en entier ---	1-5, 23-35
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 3, Mars 1994 pages 1581-1585, GÜRTLER, L. G. ET AL. 'A new subtype of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (MVP-5180) from Cameroon' --- -/-	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 Mars 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23.04.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : internationale No
PCT/FR 95/01391

C.(sate) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cites, avec, le cas echeant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visees
A	AIDS, vol. 8, no. 10, 1 Octobre 1994 pages 1405-1412, NKENGASONG J.N. ET AL. 'Genomic subtypes of HIV-1 in Cameroon' voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 591 914 (BEHRINGWERKE) 13 Avril 1994 voir le document en entier ---	1
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 3, Mars 1994 pages 1586-1596, VAN DEN HAESEVELDE, M. ET AL. 'Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent african Human Immunodeficiency Virus isolate' ---	1
P,X	THE LANCET, vol. 344, no. 8933, 12 Novembre 1994 pages 1333-1334, SCHABLE, C. ET AL. 'Sensitivity of United States HIV antibody tests for detection of HIV-1 group 0 infections' voir le document en entier ---	35,41,49
X,P	WO,A,94 28871 (ENDOCON, INC.) 22 Décembre 1994 voir le document en entier ---	1,6-8
X	WO,A,90 13564 (CONNAUGHT LABORATORIES LTD) 15 Novembre 1990 voir le document en entier ---	1,6-8
X	EP,A,0 284 587 (VIROVAHL S.A.) 28 Septembre 1988 voir le document en entier ---	1,6-8
X	WO,A,91 09869 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, THE CHANCELLOR, UNIVERSITY OF OXFORD) 11 Juillet 1991 voir le document en entier ---	1,6-8
X,P	WO,A,94 26298 (CAMBRIDGE NEUROSCIENCE) 24 Novembre 1994 voir le document en entier ---	1,6,12
X	EP,A,0 471 407 (MERCK & CO. INC.) 19 Février 1992 voir le document en entier ---	1,6,12
X	WO,A,92 05266 (VIAGENE INC.) 2 Avril 1992 voir le document en entier ---	1

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. e Internationale No
PCT/FR 95/01391

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US,A,5 352 576 (HAYNES, F.H., PALKER, T.J.) 4 Octobre 1994 voir le document en entier ---	1,6,12
X	EP,A,0 591 914 (BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT) 13 Avril 1994 voir le document en entier ---	1,6,18
X	WO,A,94 03555 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO. LTD.) 17 Février 1994 voir le document en entier ---	1,6,18
X	EP,A,0 290 893 (GENETICS SYSTEMS CORPORATION) 17 Novembre 1988 voir le document en entier ---	1,6-8
X	EP,A,0 570 357 (KATINGER, H.W.D.) 18 Novembre 1993 voir le document en entier ---	1,6
X	EP,A,0 330 359 (BIO-RAD LABORATORIES INC.) 30 Août 1989 voir le document en entier ---	1,6-8
X	WO,A,90 15158 (INSTITUT PASTEUR, INSERM) 13 Décembre 1990 voir le document en entier ---	1,6
X,P	WO,A,94 29339 (CONNAUGHT LABORATORIES LTD) 22 Décembre 1994 voir le document en entier ---	1,6-8
A,P	FR,A,2 707 091 (COHEN-HAGUENAUER) 6 Janvier 1995 -----	1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR95/01391

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2(a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n° 44 se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que la revendication 44 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition).
2. ☐ Les revendications n° se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n° sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6A.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. No. Internationale No
PC/FR 95/01391

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0591914	13-04-94	DE-A- 4233646 DE-A- 4235718 DE-A- 4244541 DE-A- 4318186 AU-B- 4880093 CA-A- 2107732 JP-A- 6225760 ZA-A- 9307371	07-04-94 28-04-94 07-07-94 05-01-95 21-04-94 07-04-94 16-08-94 29-04-94
WO-A-9428871	22-12-94	AU-B- 7101294	03-01-95
WO-A-9013564	15-11-90	CA-A- 2053921 DE-D- 69007099 DE-T- 69007099 EP-A- 0470980 ES-T- 2062521 JP-T- 4502013	04-11-90 07-04-94 01-06-94 19-02-92 16-12-94 09-04-92
EP-A-284587	28-09-88	SE-B- 468181 AU-B- 606928 AU-B- 1380788 CA-A- 1336473 CA-A- 1338028 SE-A- 8701294 SU-A- 1802871 JP-A- 2015098	16-11-92 21-02-91 29-09-88 25-07-95 30-01-96 28-09-88 15-03-93 18-01-90
WO-A-9109869	11-07-91	CA-A- 2072351 EP-A- 0510054 GB-A,B 2255093 GB-A,B 2273709 GB-A,B 2273710 US-A- 5480967	06-07-91 28-10-92 28-10-92 29-06-94 29-06-94 02-01-96
WO-A-9426298	24-11-94	AU-B- 6827894	12-12-94
EP-A-471407	19-02-92	AU-B- 642751 AU-B- 8177791 CA-A- 2048594 JP-A- 6321808	28-10-93 20-02-92 14-02-92 22-11-94

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dev. Internationale No

PCI/FR 95/01391

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9205266	02-04-92	AU-B- 665176	21-12-95
		AU-B- 8842491	15-04-92
		CA-A- 2092195	22-03-92
		EP-A- 0549723	07-07-93
		JP-T- 6500923	27-01-94

US-A-5352576	04-10-94	US-A- 5019387	28-05-91
		US-A- 5013548	07-05-91

EP-A-591914	13-04-94	DE-A- 4233646	07-04-94
		DE-A- 4235718	28-04-94
		DE-A- 4244541	07-07-94
		DE-A- 4318186	05-01-95
		AU-B- 4880093	21-04-94
		CA-A- 2107732	07-04-94
		JP-A- 6225760	16-08-94
		ZA-A- 9307371	29-04-94

WO-A-9403555	17-02-94	JP-A- 6199687	19-07-94
		AU-B- 4760193	03-03-94
		CA-A- 2141961	17-02-94
		EP-A- 0657520	14-06-95

EP-A-290893	17-11-88	US-A- 5104790	14-04-92
		AT-A,B 208987	15-01-94
		AT-T- 105938	15-06-94
		AU-B- 625720	16-07-92
		AU-B- 1508088	03-11-88
		AU-B- 616156	24-10-91
		AU-B- 7720187	19-05-88
		BE-A- 1000811	11-04-89
		CH-A- 675728	31-10-90
		DE-A- 3727703	05-05-88
		DE-D- 3889581	23-06-94
		DE-T- 3889581	20-10-94
		ES-T- 2056075	01-10-94
		FR-A- 2603107	26-02-88
		GB-A,B 2196634	05-05-88
		IE-B- 60671	10-08-94
		JP-A- 1063392	09-03-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem - Internationale No
PCT/FR 95/01391

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-290893		JP-A- 1085928	30-03-89
		LU-A- 86972	02-03-88
		NL-A- 8701950	16-03-88
		NO-A- 934897	29-12-93
		OA-A- 8652	30-11-88
		SE-A- 8703225	21-02-88
		US-A- 5166050	24-11-92
		PL-B- 161520	30-07-93
EP-A-570357	18-11-93	CA-A- 2096159	15-11-93
		DE-T- 570357	28-07-94
		ES-T- 2053413	01-08-94
		JP-A- 6293797	21-10-94
EP-A-330359	30-08-89	AU-B- 3076189	31-08-89
		JP-A- 1308299	12-12-89
WO-A-9015158	13-12-90	FR-A- 2647810	07-12-90
		EP-A- 0404625	27-12-90
		JP-T- 4505558	01-10-92
WO-A-9429339	22-12-94	AU-B- 6967394	03-01-95
		EP-A- 0702693	27-03-96
FR-A-2707091	06-01-95	AU-B- 7189394	24-01-95
		EP-A- 0659216	28-06-95
		WO-A- 9501447	12-01-95